

## Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym z regionu łódzkiego

### *Ser326Cys polymorphism of hOGG1 gene in postmenopausal breast cancer women from the Lodz region of Poland*

Anna Sobczuk<sup>1</sup>, Beata Smolarz<sup>2</sup>, Hanna Romanowicz-Makowska<sup>2</sup>, Marek Zadrożny<sup>3</sup>, Jakub Baszczyński<sup>3</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>Laboratorium Genetyki Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki; kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

<sup>3</sup>Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Piersi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki; kierownik Kliniki: dr hab. med. Marek Zadrożny

Przeгляд Menopauzalny 2009; 2: 90-93

### Streszczenie

Zmniejszenie zdolności naprawy DNA zwiększa ryzyko powstania różnych typów nowotworów, w tym raka piersi. Polimorfizm w genach naprawy DNA może wpływać na niestabilność genetyczną i proces transformacji nowotworowej. W pracy analizowano rozkład genotypów i częstości alleli polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym. Krew uzyskano od 100 kobiet chorych na raka piersi i od grupy kontrolnej ( $n = 106$ ). Polimorfizm został określony w wyniku reakcji PCR-RFLP. Nie stwierdzono związku pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a rakiem piersi. Rozkład genotypów polimorfizmu Ser326Cys w grupie badanej i kontrolnej nie różnił się znacząco ( $p > 0,05$ ) 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 nowotworu. Wyniki sugerują, że polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* może nie być związany z rozwojem raka piersi u kobiet z regionu łódzkiego.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, polimorfizm genowy

### Summary

Reduced DNA repair capacity can render a high risk of developing many types of cancer including breast cancer. Polymorphisms in DNA repair genes may contribute the genetic instability and carcinogenesis. In the present work the distribution of genotypes and frequency of alleles of the Ser326Cys polymorphism of the *hOGG1* gene in postmenopausal breast cancer women were analysed. Blood samples were obtained from 100 women with breast cancer and control ( $n = 106$ ). The polymorphisms were determined by PCR-RFLP methods. No association between Ser326Cys polymorphism of *hOGG1* and breast cancer risk was observed. The distribution of the genotypes of the Ser326Cys polymorphism 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. The results suggest that the Ser326Cys polymorphism of the *hOGG1* gene may not be linked with appearance and development of breast cancer in women from the Lodz region of Poland.

**Key words:** breast cancer, gene polymorphism

### Wstęp

Rak piersi jest nowotworem złośliwym najczęściej występującym u kobiet. Zagrożenie zachorowania rośnie wraz z wiekiem, szczególnie po menopauzie. Bardziej narażone są kobiety, u których występował rak

piersi u krewnych pierwszego stopnia (matka, siostra), szczególnie gdy zachorowanie wystąpiło w okresie przed przekwitaniem.

Wiadomo, że wady w mechanizmie naprawy DNA mogą być przyczyną procesu transformacji nowotworowej także w piersi. Powodzenie naprawy DNA zależy od

Adres do korespondencji:

dr med. **Beata Smolarz**, Laboratorium Genetyki Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

wielu czynników, w tym typu i wieku komórki oraz środowiska pozakomórkowego. W komórce, w której duża ilość DNA uległa uszkodzeniu albo której mechanizmy naprawy DNA nie są wystarczająco efektywne, mogą zajść:

- nieodwracalny stan wygaśnięcia aktywności komórki – starzenie się komórki,
- samobójcza śmierć komórki, czyli apoptoza,
- niekontrolowane podziały prowadzące do powstania nowotworu.

Zdolność komórki do naprawy własnego DNA jest istotna dla integralności fizycznej całego genomu oraz integralności informacji genetycznej, którą niesie, a więc i do prawidłowego funkcjonowania całego organizmu [1–3].

Znanych jest pięć głównych mechanizmów naprawy DNA – naprawa bezpośrednia, naprawa przez wycinanie zasady (*base excision repair* – BER), naprawa przez wycinanie nukleotydu (*nucleotide excision repair* – NER), naprawa niesparowanych zasad (*mismatch repair* – MMR) i naprawa rekombinacyjna.

Naprawa bezpośrednia koryguje wady pojedynczych zasad uszkodzonych przez oksydację, alkilację, hydrolizę czy deaminację. Oksydacyjne uszkodzenia DNA, które zwiększają ryzyko raka piersi, mogą być generowane przez reaktywne formy tlenu powstające w wyniku metabolizmu estrogenów [4, 5]. Sugeruje się, że 8-hydroksyguanina, główny produkt oksydacyjnych uszkodzeń DNA, odgrywa ważną rolę w kancerogenezie i procesach mutagenyzy [6]. 8-Hydroksyguanina jest usuwana w wyniku mechanizmu BER przez enzym glikozylazę DNA 8-okso-guaniny (*hOGG1*), katalizując uwalnianie 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny i przecięcie DNA w miejscu AP [6, 7]. W eksonie 7 genu *hOGG1* zidentyfikowano polimorfizm Ser326Cys [8, 9]. Wiadomo, że allel Cys redukuje aktywność naprawczą DNA [8] i może być związany z ryzykiem raka płuc, prostaty, przełyku i żołądka [9]. Badania epidemiologiczne polimorfizmu genu *hOGG1* odnośnie do raka piersi są nieliczne i dotyczą niewielkich populacji [10, 11].

W prezentowanej pracy badano polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym.

## Materiał i metody

### Pacjenci

Krew do badań uzyskano od 100 kobiet chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym z przerzutami ( $n = 58$ ) i bez przerzutów ( $n = 42$ ) do okolicznych węzłów chłonnych. Pacjentki były w wieku 54–82 lat (średnia wieku 58 lat). Średni rozmiar guza wynosił 20 mm (17–32 mm). Wszystkie nowotwory sklasyfikowano wg skali Scarffa-Blooma-Richardsona (14 nowotworów I stopnia, 64 – II stopnia i 22 – III stopnia). Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet ( $n = 106$ ), u których nie stwierdzono choroby nowotworowej.

## Izolacja DNA

Genomowy DNA był izolowany z 200  $\mu$ l pełnej krwi z zastosowaniem zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) zgodnie z zaleceniami producenta.

### PCR-RFLP

Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* został określony z zastosowaniem reakcji PCR-RFLP, przy użyciu odpowiednio dobranych starterów (5'-GGAAGGTGCTTGGG-GAAT-3' i 5'-ACTGCTACTAGTCTACCAG-3'). Mieszanka reakcyjna (25  $\mu$ l) obejmowała 100 ng DNA, 12,5 pmol każdego startera, 0,2 mmol/l dNTP, 2 mmol/l  $MgCl_2$  i 1 U polimerazy Taq DNA. Produkt PCR poddawano elektroforezie w 7-procentowym żelu poliakrylamidowym (PAGE) i barwiono bromkiem etydyny. Fragment długości 100 pz odpowiadał genotypowi Cys/Cys. W przypadku genotypu Ser/Cys obserwowano dwa pasma długości 100 i 200 pz, a Ser/Ser jedno pasmo długości 200 pz. Reakcja PCR została przeprowadzona w termocyklerze Thermal Cycler, GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, U.S.A). Wstępna denaturacja w 95°C trwała 5 min, właściwe 35 cykli obejmowało denaturację w 95°C przez 30 s, hybrydizację ze starterami 56°C przez 30 s, wydłużanie w 72°C przez 30 s. Produkt PCR trawiono 1 U enzymu SatI w 37°C.

## 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 tabeli I przedstawiono rozkład genotypów Ser i Cys w grupie badanej i kontrolnej. Oba rozkłady nie różniły się znacząco od przewidywanego przez prawo ( $p > 0,05$ ) Hardy'ego-Weinberga. Poza tym nie było różnic w rozkładzie częstości alleli pomiędzy pacjentami (Ser – 0,49 i Cys – 0,51) i kontrolą (Ser – 0,43 i Cys – 0,57).

Rozkład genotypów Ser/Ser, Ser/Cys i Cys/Cys oraz częstości alleli Ser i Cys dla chorych z przerzutami i bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych przedstawiono w tabeli II. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy badanymi grupami ( $p > 0,05$ ).

Badano także zależność rozkładu genotypów polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* od stopnia zaawansowania nowotworu (tab. III). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w badanych grupach ( $p > 0,05$ ).

**Tab. I.** Rozkład genotypów Ser/Ser, Ser/Cys i Cys/Cys polimorfizmu genu *hOGG1* u chorych na raka piersi i w grupie kontrolnej

	Rak piersi (n = 100)		Grupa kontrolna (n = 106)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
Ser/Ser	32	0,32	20	0,19
Ser/Cys	34	0,34	52	0,49
Cys/Cys	34	0,34	34	0,32
$\chi^2$	1,764 <sup>a</sup>		0,013	
Ser	98	0,49 <sup>b</sup>	92	0,43
Cys	102	0,51 <sup>b</sup>	120	0,57

<sup>a</sup>*p* > 0,05 w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga;<sup>b</sup>*p* > 0,05 w porównaniu z grupą kontrolną**Tab. II.** Rozkład genotypów Ser/Ser, Ser/Cys i Cys/Cys polimorfizmu genu *hOGG1* u pacjentek z przerzutami i bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych

	Bez przerzutów (n = 58)		Z przerzutami (n = 42)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
Ser/Ser	17	0,29	10	0,23
Ser/Cys	21	0,36	21	0,50
Cys/Cys	20	0,34	11	0,26
$\chi^2$	0,371 <sup>a</sup>		0,040	
Ser	55	0,47 <sup>b</sup>	41 <sup>b</sup>	0,49
Cys	61	0,53 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	0,51

<sup>a</sup>*p* > 0,05 w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga;<sup>b</sup>*p* > 0,05 w porównaniu z kontrolą**Tab. III.** Zależność rozkładu genotypów i częstości alleli polimorfizmu genu *hOGG1* w zależności od stopnia zaawansowania raka piersi<sup>a</sup>

Stopień <sup>b</sup>	I (n = 14)		II (n = 64)		III (n = 22)	
	liczba	częstość	liczba	częstość	liczba	częstość
Ser/Ser	4	0,29	23	0,36	5	0,23
Ser/Cys	7	0,50	16	0,25	11	0,50
Cys/Cys	3	0,21	25	0,39	6	0,27
$\chi^2$	0,003		0,999		0,076	
Ser	15	0,54 <sup>c</sup>	62	0,48	21	0,48
Cys	13	0,46	66	0,52	23	0,52

<sup>a</sup>*n* = 100; <sup>b</sup> skala Scarfa-Blooma-Richardsona; <sup>c</sup> *p* > 0,05 w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

## Dyskusja

System naprawy przez wycinanie zasad (BER) jest bardzo ważnym mechanizmem dla naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Istnieje wiele genów należących do BER. Jednym z nich jest gen *hOGG1* (8-oxoguanine glycosylase), który koduje glikozylazę 8-oksoguaniny, białko uczestniczące w szlaku naprawy DNA BER. Znajduje się w chromosomie 3 (3p26.2), zajmuje 16,68 kbp. Gen *OGG1* ma kilka miejsc polimorficznych.

Polimorfizm C/G w pozycji 1245 w eksonie 7 genu *hOGG1* jest związany z podstawieniem cysteiny do seryny w kodonie 326 [8]. Polimorfizm ten jest powszechny w populacji ludzkiej, stwierdzono jego występowanie u osób o różnej przynależności etnicznej. Częstość allele 1245 G jest wyższa w populacji chińskiej (64,1%) niż w japońskiej (40,5–43,3%), europejskiej (40%) czy kaukaskiej (24–26,5%), co wskazuje na różnice etniczne [8, 12, 13].

Powyższy polimorfizm genetyczny, zwany także Ser326Cys, jest często obserwowany w populacji japońskiej zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na raka płuc [8]. Ten sam polimorfizm jest obserwowany z podobną częstością u pacjentów kontynentu europejskiego chorych na nowotwory głowy i szyi lub nerki [12].

W prezentowanej pracy przeprowadzonej na 100 chorych na raka piersi nie stwierdzono korelacji pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys a występowaniem raka. Oprócz tego nie stwierdzono różnic w częstościach alleli pomiędzy grupą z przerzutami i bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, co sugeruje brak związku pomiędzy polimorfizmem a rozwojem raka piersi. Wyniki badań autorów niniejszej pracy potwierdzają analizy przeprowadzone na populacjach w Korei i Japonii [10] oraz wyniki uzyskane przez badaczy duńskich [11].

Mimo że niektóre badania nie wykazały różnic w aktywności obu wariantów, podstawienie Ser326Cys może wpływać na fosforylację białka i w konsekwencji, na jego działanie *in vivo* [14]. Ponieważ oba allele są obecne w populacji ze znaczną częstością, 326Cys prawdopodobnie cechuje się słabą penetracją, jego aktywność w warunkach braku stresu oksydacyjnego zdaje się wystarczać dla usuwania specyficznych uszkodzeń DNA i wobec tego nie jest eliminowany przez dobór naturalny.

Podsumowując, badany polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* może nie odgrywać istotnej roli w rozwoju raka piersi u polskich kobiet z regionu łódzkiego. Szerzej zakrojone badania nad funkcjonowaniem genu oraz epidemiologiczne są konieczne do zrozumienia relacji pomiędzy enzymami naprawy DNA a czynnikami środowiskowymi, które przyczyniają się do procesu transformacji nowotworowej.

## Piśmiennictwo

- Allan JM, Smith AG, Wheatley K, et al. Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood* 2004; 104: 3872-7.

2. Impact of genetic polymorphisms in DNA repair enzymes on drug resistance in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2004; 6: 79-82.
3. Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL. 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.
4. Roy D, Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutation. *Mutat Res* 1999; 424: 107-15.
5. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by catechol-estrogen and nitric oxide: implications for hormonal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 341-8.
6. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-50.
7. Boiteux S, Radicella JP. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2000; 377: 1-8.
8. Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998; 16: 3219-25.
9. Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 2005; 42: 127-41.
10. Choi JY, Hamajima N, Tajima K, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk among Asian women. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79: 59-62.
11. Vogel U, Nexø BA, Olsen A, et al. No association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 170-1.
12. Blons H, Radicella JP, Laccourreye O, et al. Frequent allelic loss at chromosome 3p distinct from genetic alternations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene in head and neck cancer. *Mol Carcinog* 1999; 26: 254-60.
13. Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, et al. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 167-72.
14. Gros L, Saparbaev MK, Laval J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 2002; 21: 8905-25.