

## Polimorfizm pojedynczych nukleotydów w genach naprawy DNA przez rekombinację homologiczną (*XRCC2* i *RAD51*) a ryzyko sporadycznego raka piersi w Polsce

### *The single nucleotide polymorphism (SNP) in DNA repair genes by homologous recombination (*XRCC2* and *RAD51*) and the risk of sporadic breast cancer in Poland*

Hanna Romanowicz<sup>1</sup>, Beata Smolarz<sup>1</sup>, Jakub Baszczyński<sup>2</sup>, Marek Zadrozny<sup>2</sup>, Andrzej Kulig<sup>1</sup>, Bożena Góralczyk<sup>3</sup>, Ireneusz Połać<sup>4</sup>, Tomasz Pertyński<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Piersi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. nadzw. dr hab. n. med. Marek Zadrozny

<sup>3</sup>Niepubliczny Zakład Opieki Zdrowotnej, Centrum Medyczne WSInf w Głownie

<sup>4</sup>Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Tomasz Pertyński

Przeгляд Menopauzalny 2011; 1: 10–14

#### Streszczenie

**Wstęp:** Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genach naprawy DNA podlegają intensywnym badaniom w związku z rozwojem różnych nowotworów, w tym raka piersi.

**Materiał i metody:** W pracy badano związek pomiędzy polimorfizmami genów naprawy DNA *XRCC2*-Arg188His i *RAD51*-135G/C a ryzykiem raka piersi. Genotypy zostały określone techniką PCR-RFLP u 80 pacjentek chorych na raka piersi i w 80 przypadkach kontroli.

**Wyniki:** Rozkład genotypów polimorfizmu Arg188His genu *XRCC2* zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej nie różnił się znacząco ( $p > 0,05$ ) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga. Genotyp C/C genu *RAD51* zwiększał ryzyko wystąpienia raka piersi [OR 2,29; 95% CI (0,91–5,72);  $p = 0,04$ ].

**Wniosek:** Polimorfizm G135C genu *RAD51* może być sporadycznie związany z rakiem piersi u polskich kobiet.

**Słowa kluczowe:** *XRCC2*, *RAD51*, rak piersi, polimorfizm genetyczny.

#### Summary

**Background:** Single nucleotide polymorphisms in the DNA repair genes have been extensively studied in association with various human cancers such as breast cancer.

**Material and methods:** We investigated an association of polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC2*-Arg188His and *RAD51*-135G/C with the breast cancer risk. Genotypes were analysed by PCR-RFLP assays in 80 patients with breast cancer and 80 controls.

**Results:** The distribution of the genotypes of *XRCC2* Arg188His in both controls and patients did not differ significantly ( $p > 0,05$ ) from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution. The C/C genotype of *RAD51* increased the risk of breast cancer occurrence (OR 2.29; 95% PU (0.91–5.72),  $p = 0.04$ ).

**Conclusion:** G135C polymorphism of the *RAD51* gene may be associated with the incidence of sporadic breast cancer in Polish women.

**Key words:** *XRCC2*, *RAD51*, breast cancer, gene polymorphism.

---

Adres do korespondencji:

Hanna Romanowicz, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel. +48 42 271 20 71, e-mail: hanna-romanowicz@wp.pl

## Wstęp

Rak piersi jest genetycznie heterogenną chorobą. Jest to najczęstszy nowotwór złośliwy u kobiet na świecie [1]. Ryzyko zachorowania na raka piersi istotnie wzrasta. Obecnie jest on najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce.

Przyczyną raka piersi mogą być mutacje powstałe w wyniku nagromadzenia się błędów w DNA powstałych w wyniku zaburzenia mechanizmów ich naprawy. Znanych jest pięć systemów naprawy DNA:

- szlak naprawy przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia,
- wycinanie zasad azotowych,
- wycinanie nukleotydów,
- naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych,
- naprawa przez rekombinację (homologiczną i niehomologiczną) [2–4].

Białko RAD51 odgrywa istotną rolę w rekombinacji homologicznej w wyniku bezpośredniego oddziaływania z XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2 oraz tworzenia kompleksu, który jest konieczny do naprawy podwójnych pęknięć DNA i utrzymania stabilności genomu [5]. W genie *RAD51* wykryto polimorfizm pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide polymorphism* – SNP), podstawienie G do C w pozycji 135 (5' – nieulegający translacji region). Polimorfizm 135G/C jest zlokalizowany w obszarze promotora i ze względu na swoje położenie może mieć istotny wpływ na regulację ekspresji mRNA. Badania kobiet będących nosicielkami mutacji w genie *BRCA1*, wykazały, że allel 135C jest związany z dwa razy większym ryzykiem raka piersi i jajników niż allel G [6]. Także u kobiet będących nosicielkami mutacji w genie *BRCA2* allel C podwyższa ryzyko tego nowotworu [7–9].

Gen *XRCC2* jest zlokalizowany w obszarze 7q36.1. Stanowi on istotny element systemu naprawy przez rekombinację homologiczną, a zaburzenia jego funkcji mogą mieć związek z rozwojem nowotworów [10]. Gen *XRCC2* jest polimorficzny. Polimorfizm Arg188His zlokalizowany w eksonie 3 może być związany z rozwojem różnych nowotworów, takich jak rak trzustki i krtani u osób palących [11–13]. Allel 188His genu *XRCC2* może być związany ze wzrastającym ryzykiem raka piersi, natomiast nie ma związku z rozwojem raka pęcherza moczowego, jelita grubego i skóry [14–17].

W prezentowanej pracy badano związek pomiędzy polimorfizmami pojedynczych nukleotydów Arg188His genu *XRCC2* i G135C genu *RAD51* a rakiem piersi u polskich kobiet.

## Materiał i metody

### Pacjenci

Badania zostały przeprowadzone u 80 pacjentek chorych na raka piersi. Materiał stanowiły wycinki z gu-

zów w postaci bloczków parafinowych zgromadzonych w archiwum Zakładu Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki. Średnia wieku pacjentek wynosiła 58 lat (48–72). Średni rozmiar guza – 20 mm (17–32 mm). U żadnej z pacjentek nie stwierdzono przerzutów odległych. Stopień zaawansowania nowotworu oceniany był wg trzystopniowej skali Scarfa-Bloomfielda-Richardsona. Do badań wykorzystano 35 przypadków I stopnia zaawansowania, 41 przypadków II stopnia i 4 przypadki III stopnia zaawansowania nowotworu. Jako kontrolę użyto DNA uzyskany od osób, u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej ( $n = 80$ ). DNA izolowano przy zastosowaniu komercyjnie dostępnego zestawu QIAmp Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) zgodnie z zaleceniami producenta.

### Analiza polimorfizmu *RAD51*

Polimorfizm *RAD51* analizowano przy zastosowaniu techniki PCR-RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Mva*I. Allel dziki odpowiadał fragmentom długości 86 i 71-pz. Allel 135C odpowiadał długości 157 pz. Zastosowano startery o następujących sekwencjach: 5'TGG GAA CTG CAA CTC ATC TGG 3' i 5'GCG CTC CTC TCT CCA GCAG 3'.

Reakcję łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) przeprowadzono w termocyclerze GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) thermal cycler. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25  $\mu$ l i obejmowała: 5 ng genomowego DNA, 0,2  $\mu$ mol starterów (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM dNTPs i 1 U Taq Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Warunki reakcji PCR były następujące: 94°C przez 60 s, 54°C przez 30 s, 72°C przez 40 s, liczba cykli – 35. Po trawieniu enzymem *Mva*I przez 4 godz. w 37°C próbka podlegała elektroforezie na 7-procentowym żelu poliakrylamidowym i analizowana po barwieniu bromkiem etydyny. Każda próbka była klasyfikowana do jednego z trzech genotypów: G/G, G/C i C/C.

### Analiza polimorfizmu *XRCC2*

Polimorfizm genu *XRCC2* został określony przez PCR-RFLP z zastosowaniem starterów 5'TGTAGTCCCATCTCTCTGC3' i 5'AGTTGCTGCCATGCCTTACA3'. 25  $\mu$ l mieszaniny PCR obejmowało 100 ng DNA, 12,5 pmol każdego startera, 0,2 mmol/l dNTP, 2 mmol/l  $MgCl_2$  i 1 U Taq DNA Polymerase. Produkt o długości 290 pz był trawiony całą noc 1 U *Hpa*NI w 37°C. Allel Arg odpowiadał fragmentowi długości 290 pz, allel His dwóm fragmentom – 148 oraz 142 pz.

### Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono, stosując program komputerowy STATISTICA ver. 5.0 (StatSoft, Inc.). Wynik uznawano za istotny statystycznie przy  $p < 0,05$ . Analiza statystyczna rozkładu genotypów oraz alleli w grupie badanej i kontrolnej przeprowadzona została po wcześniejszym potwierdzeniu, że otrzymane układy pozostają w stanie równowagi wg reguły Hardy'ego-Weinberga.

### Wyniki

Tabela I przedstawia rozkład genotypów polimorfizmu 135G/C genu *RAD51* w grupie badanej i kontrolnej. Wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy badanymi grupami ( $p < 0,05$ ). Częstości alleli G i C wynosily odpowiednio 0,37/0,63 u pacjentek i 0,53/0,47 w grupie kontrolnej. U pacjentek obserwowane częstości genotypów G/G, G/C i C/C różniły się znacząco ( $p < 0,05$ ) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga. Częstość genotypu C/C była statystycznie znacząca [OR 2,29, 95% CI (0,91–5,72);  $p = 0,04$ ] (tab. I). Występowanie genotypu CC zwiększa ok. 2-krotnie szansę rozwoju raka piersi.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w częstościach alleli i genotypów polimorfizmu Arg188His

genu *XRCC2* pomiędzy grupą badaną i kontrolną ( $p > 0,05$ ; tab. II). Kobiety chore na raka piersi charakteryzowały się następującą częstością genotypów: Arg/Arg – 0,25, Arg/His – 0,50 i His/His – 0,25; natomiast grupa kontrolna odpowiednio: 0,26, 0,49, i 0,25 dla tych samych genotypów.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów i częstości alleli w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu (tab. III).

### Dyskusja

Dane z piśmiennictwa wskazują, że geny uczestniczące w naprawie DNA i w utrzymaniu stabilności genomu odgrywają istotną rolę w obronie organizmu przed powstawaniem mutacji prowadzących do chorób nowotworowych [18]. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów są obecne w genach naprawy DNA, ale ich znaczenie w rozwoju chorób nowotworowych nie jest do końca wyjaśnione.

Polimorfizmy mogą mieć funkcjonalne znaczenie i odpowiadać za obniżenie zdolności mechanizmu naprawy DNA w nowotworach, w tym w raku piersi.

W prezentowanej pracy badano, czy SNP w genach naprawy DNA *XRCC2*-Arg188His oraz *RAD51*-135G/C mogą być związane z ryzykiem raka piersi.

**Tab. I.** Rozkład genotypów G/G, G/C i C/C i częstości alleli G i C polimorfizmu G135C genu *RAD51* u chorych na raka piersi ( $n = 80$ ) i w grupie kontrolnej ( $n = 80$ )

	Grupa chorych na raka piersi		Grupa kontrolna		OR (95% CI)	$p^*$
	liczba	(%)	liczba	(%)		
G/G	19	24	22	28	0,86 (0,37–1,97)	0,729
G/C	22	28	41	51	0,53 (0,27–1,06)	0,072
C/C	39	48	17	21	<b>2,29 (0,91–5,72)</b>	<b>0,040</b>
G	60	37	85	53	0,71 (0,47–1,04)	0,084
C	100	63	75	47	1,33 (0,92–1,93)	0,128

OR – iloraz szans; 95% CI – 95-procentowy przedział ufności; \* – test  $\chi^2$

**Tab. II.** Rozkład genotypów Arg/Arg, Arg/His i His/His oraz częstości alleli Arg i His polimorfizmu Arg188His genu *XRCC2* u chorych na raka piersi ( $n = 80$ ) i w grupie kontrolnej ( $n = 80$ )

	Grupa chorych na raka piersi		Grupa kontrolna		OR (95% CI)	$p^*$
	liczba	(%)	liczba	(%)		
Arg/Arg	20	25	21	26	0,95 (0,23–1,09)	0,134
Arg/His	40	50	39	49	1,02 (0,10–1,88)	0,542
His/His	20	25	20	25	1,00 (0,32–2,87)	0,345
Arg	80	50	81	51	0,98 (0,23–1,99)	0,432
His	80	50	79	49	1,01 (0,22–1,76)	0,237

OR – iloraz szans; 95% CI – 95-procentowy przedział ufności; \* – test  $\chi^2$

Tab. III. Zależność rozkładu polimorfizmów genów *XRCC2* i *RAD51* od stopnia zaawansowania raka piersi

Polimorfizm				
<i>XRCC2</i> -Arg188His	stadium I (%) (n = 35)	stadium II + III (%) (n = 45)	OR (95% CI)	p*
Arg/Arg	29 (82,8)	34 (75,5)	1,01 (0,49–1,76)	0,922
Arg/His	5 (14,2)	11 (24,4)	0,85 (0,36–2,19)	0,832
His/His	1 (0,3)	0	-----	-----
Arg	63 (90)	79 (87,7)	0,90 (0,70–1,18)	0,481
His	7 (10)	11 (12,3)	1,00 (0,42–2,26)	1,000
<i>RAD51</i> -135G/C	stadium I (%) (n = 35)	stadium II + III (%) (n = 45)	OR (95% CI)	p*
G/G	22 (62,8)	27 (60)	0,98 (0,54–1,56)	1,000
G/C	11 (31,4)	14 (31,1)	1,02 (0,53–1,84)	1,000
C/C	2 (5,7)	4 (8,9)	1,55 (0,40–6,71)	0,481
G	55 (78,6)	68 (75,6)	0,87 (0,66–1,16)	0,400
C	15 (21,4)	22 (24,4)	1,00 (0,62–1,16)	0,920

OR – iloraz szans; 95% CI – 95-procentowy przedział ufności; \* – test  $\chi^2$

Nie wykazano związku pomiędzy występowaniem sporadycznego raka piersi a polimorfizmem Arg188His genu *XRCC2* u polskich kobiet. Uzyskane wyniki są zgodne z najnowszymi danymi piśmiennictwa, które wskazują na brak bezpośredniego związku pomiędzy tym polimorfizmem a ryzykiem nowotworu także u kobiet innych populacji [19, 20].

Interesujący jest fakt, że w populacji polskiej polimorfizm Arg188His *XRCC2* nie jest związany z ryzykiem raka piersi u kobiet obciążonych genetycznie mutacjami w genie *BRCA1* [21].

W pracy badano także znaczenie polimorfizmu *RAD51*-135G/C u chorych na raka piersi. Najnowsze dane piśmiennictwa wskazują, że może on mieć związek z rakiem piersi, zwłaszcza obecność homozygoty 135C/C [22, 23].

Dane dla populacji polskiej nie wskazują jednoznacznie, jaką rolę odgrywa ten polimorfizm. Jakubowska i wsp. sugerują, że polimorfizm 135G/C genu *RAD51* może być czynnikiem ryzyka raka piersi u kobiet będących nosicielkami mutacji *BRCA1*, ale nie w przypadku sporadycznego nowotworu [24].

Krupa i wsp. wykazali, że współistnienie genotypów Thr241Met genu *XRCC3* oraz 135G/C *RAD51* obniża ryzyko raka piersi w populacji polskiej [25].

Zespół Błasiaka i wsp. sugeruje, że polimorfizm 135G/C genu *RAD51* może nie być bezpośrednio związany z rozwojem sporadycznego raka piersi i nie może być użytecznym markerem tej choroby u kobiet w Polsce [26].

Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy wskazują, że polimorfizm 135G/C może być związany ze sporadycznym rakiem piersi u polskich kobiet. Rozkład genotypów G/G, G/C i C/C u pacjentów odbiegał od rozkładu zgodnego z prawem Hardy'ego-Weinberga, z przewagą

homozygoty C/C (OR 2,29; 95% CI 0,91–5,72). Genotyp CC może zwiększać ok. 2-krotnie ryzyko wystąpienia tej choroby.

Jest możliwe, że allel C jest w korelacji z innymi, nieznanymi jeszcze mutacjami zlokalizowanymi poza regionem kodującym genu *RAD51*, które mogą być istotne dla stężenia białka *RAD51* w osoczu.

## Wniosek

Badania wskazują, że polimorfizm genu *RAD51* może być związany z rakiem piersi u polskich kobiet. Do potwierdzenia tego przypuszczenia konieczne są badania przeprowadzone na większej populacji.

## Piśmiennictwo

- Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al. Breast cancer. Lancet 2005; 365: 1727-41.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. Science 2001; 291: 1284-9.
- Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, et al. Base excision repair of DNA in mammalian cells. FEBS Lett 2000; 476: 73-7.
- Hazra TK, Das A, Das S, et al. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. DNA Repair 2007; 6: 470-80.
- Thacker J. The *RAD51* gene family, genetic instability and cancer. Cancer Lett 2005; 219: 125-35.
- Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, et al. The *RAD51* 135 G>C polymorphism modifies breast cancer and ovarian cancer risk in Polish *BRCA1* mutation carriers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16: 270-5.
- Antoniou AC, Sinilnikova OM, Simard J, et al. *RAD51* 135G-->C modifies breast cancer risk among *BRCA2* mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. Am J Hum Genet 2007; 81: 1186-200.
- Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the *RAD51* gene modifies breast cancer risk in *BRCA2* carriers, but not in *BRCA1* carriers or noncarriers. Br J Cancer 2004; 90: 2002-5.
- Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, et al. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of *RAD51* and risk of cancer among

- BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 955-60.
10. Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1081-90.
  11. Jiao L, Hassan MM, Bondy ML, et al. XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 360-7.
  12. Benhamou S, Tuimala J, Bouchardy C, et al. DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 2004; 112: 901-4.
  13. Yen CY, Liu SY, Chen CH, et al. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 271-7.
  14. 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.
  15. Matullo G, Guarrera S, Sacerdote C, et al. Polymorphisms/haplotypes in DNA repair genes and smoking: a bladder cancer case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2569-78.
  16. Tranah GJ, Giovannucci E, Ma J, et al. XRCC2 and XRCC3 polymorphisms are not associated with risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1090-1.
  17. Han J, Colditz GA, Samson LD, Hunter DJ. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and skin cancer risk. *Cancer Res* 2004; 64: 3009-13.
  18. Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 157-61.
  19. Yu KD, Chen AX, Qiu LX, et al. XRCC2 Arg188His polymorphism is not directly associated with breast cancer risk: evidence from 37,369 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123: 219-25.
  20. Brooks J, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. Polymorphisms in RAD51, XRCC2, and XRCC3 are not related to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1016-9.
  21. Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, et al. BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks in Poland: no association with commonly studied polymorphisms. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 201-11.
  22. Gao LB, Pan XM, Li LJ, et al. RAD51 135G/C polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis from 21 studies. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125: 827-35.
  23. Wang Z, Dong H, Fu Y, Ding H. RAD51 135G>C polymorphism contributes to breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 26,444 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124: 765-9.
  24. Jakubowska A, Jaworska K, Cybulski C, et al. Do BRCA1 modifiers also affect the risk of breast cancer in non-carriers? *Eur J Cancer* 2009; 45: 837-42.
  25. Krupa R, Synowiec E, Pawlowska E, et al. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2009; 87: 32-5.
  26. Błasiak J, Przybyłowska K, Czechowska A, et al. Analysis of the G/C polymorphism in the 5'-untranslated region of the RAD51 gene in breast cancer. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 249-53.