

Polimorfizm Ile655Val genu *erbB-2* u kobiet z rakiem jajnika w okresie menopauzalnym

*The Ile655Val polymorphism of *erbB-2* gene in menopausal women with ovarian cancer*

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Tomasz Pertyński²

*Podwyższony poziom ekspresji genu *erbB-2* obserwuje się w 10 do 50% przypadków raka jajnika. Wysoki poziom *erbB-2* jest związany ze złym rokowaniem dla pacjentki i krótkim okresem wolnym od nawrotu tej choroby. Znaczenie dla występowania i progresji nowotworów może mieć nie tylko poziom ekspresji genu *erbB-2*, ale także zmiany w aktywności receptora *erbB-2*. W genie *erbB-2* w pozycji 1980 zidentyfikowano polimorfizm G/A, którego konsekwencją jest podstawienie Ile/Val w kodonie 655 w obrębie domeny transbłonowej, co może mieć wpływ na aktywność receptora.*

Materiały i metody: W pracy przedstawiono rozkład genotypów oraz częstość alleli polimorfizmu Ile655Val genu *erbB-2* u chorych na raka jajnika. Materiał do badań stanowiły próbki nowotworów od pacjentek w wieku menopauzalnym, utrwalone w parafinie. Polimorfizm Ile655Val genu *erbB-2* był określany przez reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) z zastosowaniem starterów allelospecyficznych.

Wyniki: Nie wykazano statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) w rozkładzie genotypów i częstości alleli polimorfizmu Ile655Val genu *erbB-2* między grupą pacjentek i grupą kontrolną. Ponadto nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) w rozkładzie genotypów i częstości alleli polimorfizmu Ile655Val między grupami pacjentek z nowotworami o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO.

Wnioski: Otrzymane wyniki sugerują, że polimorfizm Ile655Val w genie *erbB-2* może nie być związany z występowaniem oraz progresją nowotworów jajnika, jednak dla weryfikacji konieczne jest rozszerzenie grupy badanej.

Słowa kluczowe: gen *erbB-2*, polimorfizm genowy, rak jajnika, menopauza

(Przegląd Menopauzalny 2003, 1:28–31)

Amplifikację oraz wzmożoną ekspresję genu *erbB-2* stwierdza się w wielu typach nowotworów. U pacjentek z nowotworami sutka i jajnika podwyższony po-

ziom *erbB-2* związany jest z krótkim okresem przeżycia pacjentek oraz krótkim okresem bez nawrotu choroby [1, 3, 9]. Wykazano także korelację między podwyż-

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

² Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. n. med. Tomasz Pertyński



szonym poziomem białka erbB-2 i stopniem złośliwości nowotworu, z uwzględnieniem jego zdolności do przerzutowania [10, 11].

Białko erbB-2 o masie cząsteczkowej 185 kDa zaliczane jest do rodziny receptorów błonowych o aktywności kinazy tyrozynowej klasy I, do której zaklasyfikowane są także 3 inne receptory: EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*; *HER1/erbB-1*), erbB-3 (HER3) oraz erbB-4 (HER4) [4, 5]. Białko erbB-2 w swojej strukturze zawiera domenę zewnątrzkomórkową, wiążącą ligand, domenę transbłonową oraz domenę cytoplazmatyczną o aktywności kinazy tyrozynowej zaangażowaną w transdukcję sygnału [13].

Receptor erbB-2 nie jest bezpośrednio aktywowany przez czynniki wzrostu, takie jak EGF (ang. *epidermal growth factor*), ale do jego stymulacji dochodzi po przyłączeniu się tych czynników do innych receptorów należących do rodziny receptorów erbB. Sugeruje to, że receptor erbB-2 pełni funkcję koreceptora będąc zaangażowanym w interakcje receptor-receptor [15].

Zwiększona zdolność nowotworu do inwazyjności i przerzutowania związana z podwyższonym poziomem białka erbB-2 może wynikać ze wzmożonej ruchliwości komórki aktywowanej przez ten receptor. Wykazano, że w komórce prawidłowej białko erbB-2 zlokalizowane jest w wypustkach cytoplazmatycznych, takich jak mikrokosmki, lamelipodia i pseudopodia, które są niezbędne dla procesów migracji komórki [7]. Podobną lokalizację białka erbB-2 zaobserwowano w mikrokosmkach i wypustkach cytoplazmatycznych komórek nowotworowych sutka. W komórkach tych po ekspozycji na czynniki chemotaktyczne obserwowano zmiany morfologiczne wypustek i mikrokosmków, którym towarzyszyła agregacja białka erbB-2 [8]. Potwierdzeniem udziału receptora erbB-2 w ruchliwości komórek było zidentyfikowanie czynnika ruchliwości (ang. *motility factor*), który po związaniu się z receptorem erbB-2 powodował pofałdowanie błony cytoplazmatycznej oraz stymulację do chemotaksji [6].

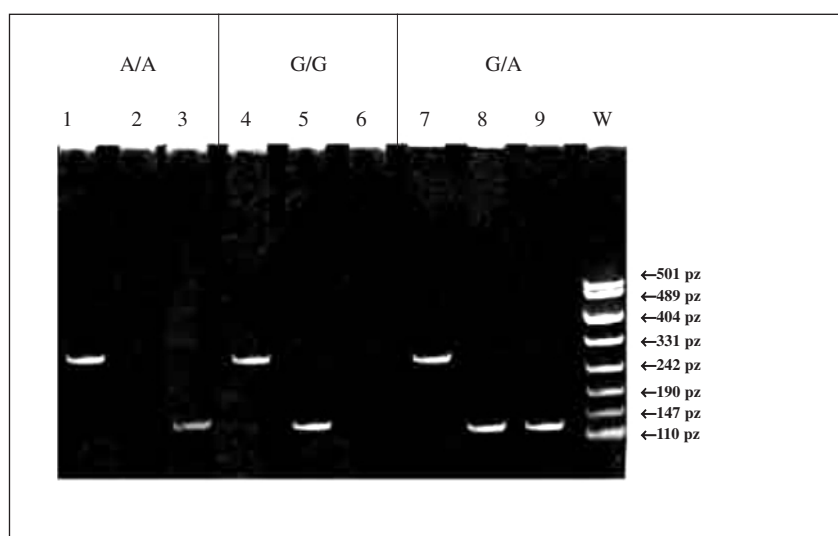
Ze względu na tak duże znaczenie białka erbB-2 w progresji nowotworów, istotnym wydaje się badanie znaczenia zmienności genetycznej genu *erbB-2* zarówno dla poziomu ekspresji, jak i dla funkcjonalności receptora erbB-2 oraz określenie ich konsekwencji dla rozwoju chorób nowotworowych. W genie erbB-2 w regionie kodującym domenę transbłonową zidentyfikowano polimorfizm G/A, którego konsekwencją jest podstawienie Ile/Val w kodonie 655 [12]. W pracy przedstawiono rozkład genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu Ile655Val genu *erbB-2* u pacjentek z nowotworem jajnika.



Materiał i metody

Pacjenci. Materiał do badań stanowiły próbki pobrane z nowotworów jajnika pochodzących od 50 pacjentek w wieku menopauzalnym. Próbkę nowotworów były utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie. Stopień zaawansowania nowotworów był oceniany wg klasyfikacji FIGO (ang. *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*). Grupę kontrolną stanowiły próbki krwi pobrane od 50 dobranych wiekowo kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej.

Izolowanie DNA. DNA z krwi oraz materiału nowotworowego izolowano z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu QI Amp Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta.



Ryc. 1. Przykładowy elektroferrogram rozdzielu produktów amplifikacji. Ścieżki 1, 4, 7 – produkty amplifikacji obszaru kontrolnego, ścieżki 2, 5, 8 – produkty amplifikacji ze starterem allelospecyficznym G, ścieżki 3, 6, 9 – produkty amplifikacji ze starterem allelospecyficznym A, ścieżka W – wzorzec mas cząsteczkowych

Określanie polimorfizmu Ile655Val. Polimorfizm Ile655Val genu *erbB-2* był określany poprzez reakcję PCR ze starterami allelospecyficznymi (ASA): starter G 5'-GCA GGA GAG CAG AGA GCC-3' specyficzny dla allele G starter A 5'-GCA GGA GAG CAG AGA GCC-3' specyficzny dla allele A każdy w oddzielnej reakcji PCR, razem ze starterem D: 5'-AGG ATT CCA ACG ACC ACC A-3'. Dla zweryfikowania amplifikacji DNA przy braku odpowiedniego allele w genomowym DNA przeprowadzano amplifikację startera D ze starterem komplementarnym do sekwencji leżącej powyżej miejsca polimorficznego starter U 5'-CTT CAG CA-AACG TAC CAT GC-3'. Amplifikację przeprowadzano w 25 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie: 50 ng genomowego DNA, 10 pmol każdego z starterów,

200 mmoli każdego dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 U polimerazy Taq. W następujących warunkach termicznych: 1 minuta 95°C, a następnie 30 cykli: 30 sekund 95°C, 30 sekund 59°C, 30 sekund 72°C, następnie 7 minut 72°C. Po amplifikacji 5 µl mieszaniny reakcyjnej rozdzielano w 8% żelu poliakrylamidowym i wizualizowano się przy użyciu bromku etydyny (0,5 mg/ml) w świetle ultrafioletowym (ryc. 1.).

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 często-

Tab. I. Polimorfizm Ile655Val genu *erbB-2*. Rozkład genotypów oraz częstość alleli w grupie pacjentek z rakiem jajnika oraz grupie kontrolnej

Genotyp	Pacjentki z rakiem jajnika (n = 50)		Grupa kontrolna (n = 50)	
	Liczebność	Częstość	Liczebność	Częstość
Ile/Ile	33	0,66	36	0,72
Ile/Val	12	0,24	11	0,22
Val/Val	5	0,10	3	0,06
χ^2	4,521*		2,429*	
Ile	78	0,78	83	0,83
Val	22	0,22	17	0,17

p>0,05, rozkład zgodny z prawem Hardy-Weinberga



Tab. II. Polimorfizm Ile655Val genu *erbB-2*. Rozkład genotypów oraz częstość alleli w grupie pacjentek z rakiem jajnika w różnym stopniu zaawansowania wg FIGO

Pacjentki z rakiem jajnika (n = 50)						
I (n=12)			II (n=25)		III (n=13)	
Genotyp	Liczebność	Częstość	Liczebność	Częstość	Liczebność	Częstość
Ile/Ile	8	0,66	17	0,68	8	0,61
Ile/Val	3	0,25	6	0,24	3	0,23
Val/Val	1	0,08	2	0,08	2	0,15
Ile	19	0,78	40	0,80	19	0,73
Val	5	0,22	10	0,20	7	0,27

ściami alleli i genotypów dla poszczególnych grup oceniana była testem χ^2 .

Wyniki

Stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) w rozkładzie genotypów i częstości alleli polimorfizmu Ile655Val genu *erbB-2* między grupą pacjentek i grupą kontrolną (tab. I.). Ponadto wykazano brak statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) w rozkładzie genotypów i częstości alleli polimorfizmu Ile655Val między grupami pacjentek z nowotworami o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO (tab. II.). Rozkłady genotypów w obu grupach były zgodne z prawem Hardy'ego-Weinberga ($p > 0,05$).

Dyskusja

Amplifikację lub podwyższony poziom ekspresji genu *erbB-2* obserwuje się w 10 do 50% przypadków raka jajnika. Wiadomo, że wysoki poziom *erbB-2* jest związany ze złym rokowaniem dla pacjentki i krótkim okresem wolnym od nawrotu tej choroby [1, 14]. Znaczenie dla występowania bądź progresji nowotworów może mieć nie tylko poziom ekspresji genu *erbB-2*, ale także zmiany w aktywności receptora *erbB-2*. W genie *erbB-2* w pozycji 1980 zidentyfikowano polimorfizm G/A, którego kon-

sekwencją jest podstawienie Ile/Val w kodonie 655 w obrębie domeny transbłonowej receptora [12]. Obecnie nie jest jasne, jakie konsekwencje ma podstawienie Ile/Val w kodonie 655 dla funkcjonowania receptora *erbB-2*. Stwierdzono jednak, że wariant Val jest związany ze zwiększonym ryzykiem występowania nowotworów sutka co sugeruje, że polimorfizm ten może mieć wpływ na aktywność biologiczną receptora *erbB-2* [2, 16].

Celem naszej pracy było określenie znaczenia polimorfizmu Ile655Val genu *erbB-2* dla występowania i progresji nowotworów jajnika. Wykazanie dodatniej korelacji między występowaniem allelu Val i progresją nowotworów jajnika, pozwoliłoby na zastosowanie polimorfizmu Ile655Val jako czynnika rokowniczego w tych nowotworach. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w częstościach występowania alleli Ile i Val między grupą badaną i kontrolną ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki wskazują, że polimorfizm Ile/Val może nie być związany z występowaniem nowotworów jajnika. Ponadto nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w rozkładzie genotypów i częstości alleli Ile i Val między grupami pacjentek z nowotworami o różnym stopniu zaawansowania, co sugeruje brak zależności między polimorfizmem Ile/Val i progresją nowotworów jajnika. Ponieważ obserwuje się związek pomiędzy wariantem Val i zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka sutka konieczne jest rozszerzenie grupy badanych pacjentek z rakiem jajnika w celu weryfikacji otrzymanych wyników.

Summary

Introduction: The high level of *erbB-2* gene expression is observed in 10–50% cases of ovarian cancer. The high level of *erbB-2* predicts poor prognosis for patients. The significance for appearance and cancer progression may have not only high level of *erbB-2* expression but changes in its receptor activation. The Ile655Val polymorphism in position 1980 located at 655 codon of *erbB-2* gene may have functional significance in regulation of receptor activation.



Materials and methods: In these studies the distribution of genotypes and frequency of alleles of the Ile655Val polymorphism of *erbB-2* gene in samples of ovarian cancer was investigated. Paraffin embedded tumour tissues were obtained from menopausal women with ovarian cancer. The genotypes of Ile655Val polymorphism were determined by PCR amplification using the allele specific primers.

Results: The distribution of the genotypes of the Ile655Val polymorphism did not differ significantly ($p > 0.05$) between patients and control. Additionally, there were no significant differences ($p > 0.05$) in genotype distributions and allele frequencies between subgroups assigned to histological stage (FIGO).

Conclusion: The obtained results suggest that the Ile655Val polymorphism of *erbB-2* gene may not be linked with appearance and development of ovarian cancer. Further studies, conducted on a larger population, are required to clarify this point.

Key words: *erbB-2* gene, gene polymorphism, ovarian cancer, menopause

Piśmiennictwo

1. Afify AM, Werness BA, Mark HF. *HER-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma*. Exp Mol Pathol 1999; 66: 163-9.
2. Ameyaw MM, Tayeb M, Thornton N, et al. *Ethnic variation in the HER-2 codon 655 genetic polymorphism previously associated with breast cancer*. J Hum Genet 2002; 47: 172-5.
3. Anbazhagan R, Gelber RD, Bettelheim R, et al. *Association of c-erbB-2 expression and S-phase fraction in the prognosis of node positive breast cancer*. Ann Oncol 1991; 2: 47-53.
4. Carpenter G. *Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens*. Annu Rev Biochem 1987; 56: 881-914.
5. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, et al. *Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene*. Science 1985; 230: 1132-9.
6. De Potter CR, Schelfhout AM. *The neu-protein and breast cancer*. Virchows Archiv 1995; 426: 107-15.
7. De Potter CR, Qutacker J, Maertens G, et al. *The subcellular location of the neu protein in human normal and neoplastic cells*. Int J Cancer 1989; 44: 969-74.
8. De Potter CR, Qutacker J. *The p185^{neu} protein is localized on cell organelles involved in cell motility*. Clin Exp Metastasis 1993; 11: 462-72.
9. Gullick WJ, Berger MS, et al. *Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells*. Int J Cancer 1987; 40: 246-54.
10. Kapitanović S, Radošević S, Kapitanović M., et al. *The expression of p185^{HER-2/neu} correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer*. Gastroenterology 1997; 112: 1103-13.
11. Kay EW, Mulcahy H, Walsh CB, et al. *Cytoplasmatic c-erbB-2 protein expression correlates with survival in Dukes'B colorectal carcinoma*. Histopathology 1994; 25: 455-61.
12. Papewalis J, Nikitin A, Yu, Rajewsky MF. *G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene*. Nucleic Acids Res 1991; 19: 5452.
13. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. *The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185 000-Mr tumor antigen*. Nature 1985; 312: 513-6.
14. Seki A, Yoshinouchi M, Seki N, et al. *Detection of c-erbB-2 and FGF-3 (INT-2) gene amplification in epithelial ovarian cancer*. Int J Oncol 2000; 17: 103-6.
15. Tzahar E, Yarden Y. *The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands*. Biochim Biophys Acta 1998; 1377: M25-M37.
16. Xie D, Shu XO, Deng Z, et al. *Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk*. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 412-7.

Adres do korespondencji

dr n. med. Hanna Romanowicz-Makowska
Pracownia Biologii Molekularnej
Zakładu Patomorfologii Klinicznej ICZMP
ul. Rzgowska 281/289
93-338 Łódź

