

Amplifikacja genu c-erbB2 (Her-2/neu) u kobiet z rakiem sutka

– badania wstępne

C-erbB2 (Her-2/neu) gene amplification in women with breast cancer – initial studies

Marek Zadrożny¹, Beata Smolarz², Hanna Romanowicz-Makowska², Elżbieta Kozłowska², Andrzej Kulig²

Onkogen c-erbB2 (Her2/neu) zlokalizowany w ramieniu dłuższym chromosomu 7 koduje transbłonową glikoproteinę p185 o funkcji receptora kinazy tyrozynowej. Dane literaturowe wskazują, że podwyższona ekspresja onkogenu c-erbB2 (Her-2/neu) może być związana z występowaniem raka sutka u kobiet. Celem naszych badań stało się określenie związku pomiędzy stopniem amplifikacji genu c-erbB2 a występowaniem raka sutka u kobiet w wieku menopauzalnym. Materiał do badań stanowiły utrwalone w parafinie wycinki z guza piersi (n = 20). Jako grupę kontrolną zastosowano krew pobraną od kobiet (n = 20), u których nie stwierdzono występowania nowotworu. Amplifikacja genu c-erbB2 była analizowana przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z zastosowaniem odpowiednio dobranych starterów. Stopień amplifikacji genu c-erbB2 był znacząco wyższy w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (p<0,05). Zwiększona aktywność genu c-erbB2 może być związana z występowaniem raka sutka u kobiet w wieku menopauzalnym.

Słowa kluczowe: gen c-erbB2 (Her-2/neu), amplifikacja, rak sutka, menopauza, PCR

(Przegląd Menopauzalny 2002; 1: 11–14)

Wstęp

Poznanie znaczenia onkogenów oraz genów supresorowych stworzyło nowe możliwości w wykorzystaniu markerów nowotworowych. W ostatnich latach liczne badania dokumentują, że zmiany (punktowe mutacje, nadekspresja) onkogenów i genów supresorowych mogą być wykrywane w ludzkich tkankach nowotworowych. Mogą one odgrywać rolę użytecznych molekularnych markerów dla poznania procesu kancerogenezy *in vivo*.

Bezpośrednie wykrywanie genetycznych zaburzeń wymaga dostępu do DNA lub mRNA tkanek macierzystych. Wykrywanie zmutowanych postaci genów, zmiany stopnia ich ekspresji a co za tym idzie – zmiany ilości onkoprotein we krwi może być zastosowane jako molekularne markery kancerogenezy. Zalicza się do nich czynniki wzrostowe, receptory międzybłonowych czynników wzrostu, onkogeny kodujące białka cytoplazmatyczne uczestniczące w wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału oraz onkoge-

¹ Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Piersi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik Kliniki: dr med. Marek Zadrożny

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



ny kodujące białka o charakterze czynników transkrypcyjnych [2].

Jednym z najlepiej poznanych onkogenów kodujących białka o charakterze receptorów czynników wzrostowych o aktywności kinazy tyrozynowej jest onkogen *erbB*. Przekształcenie protoonkogenu *erbB* jest wynikiem delecji znacznej części zewnątrzkomórkowej domeny białka wiążącego ligand. W nowotworach ludzkich obserwuje się zwiększoną ekspresję genów kodujących białka o charakterze receptorów transbłonowych czynników wzrostu (szczególnie *c-erbB1* i *c-erbB2*) [7, 10]. Proces wzrostu sygnału transdukcji dla tych receptorów ukazuje włączenie dimeryzacji ze wzrostem wewnątrzkomórkowej aktywności kinazy tyrozynowej przez proteolityczne cięcie domeny zewnątrzkomórkowej (ECD) receptora, ze zgromadzeniem ECD w środowisku zewnątrzkomórkowym. Dlatego wykrycie wzrostu poziomu receptora *c-erbB2* we krwi staje się potencjalnym molekularnym markerem dla rozwoju raka [9, 11, 12].

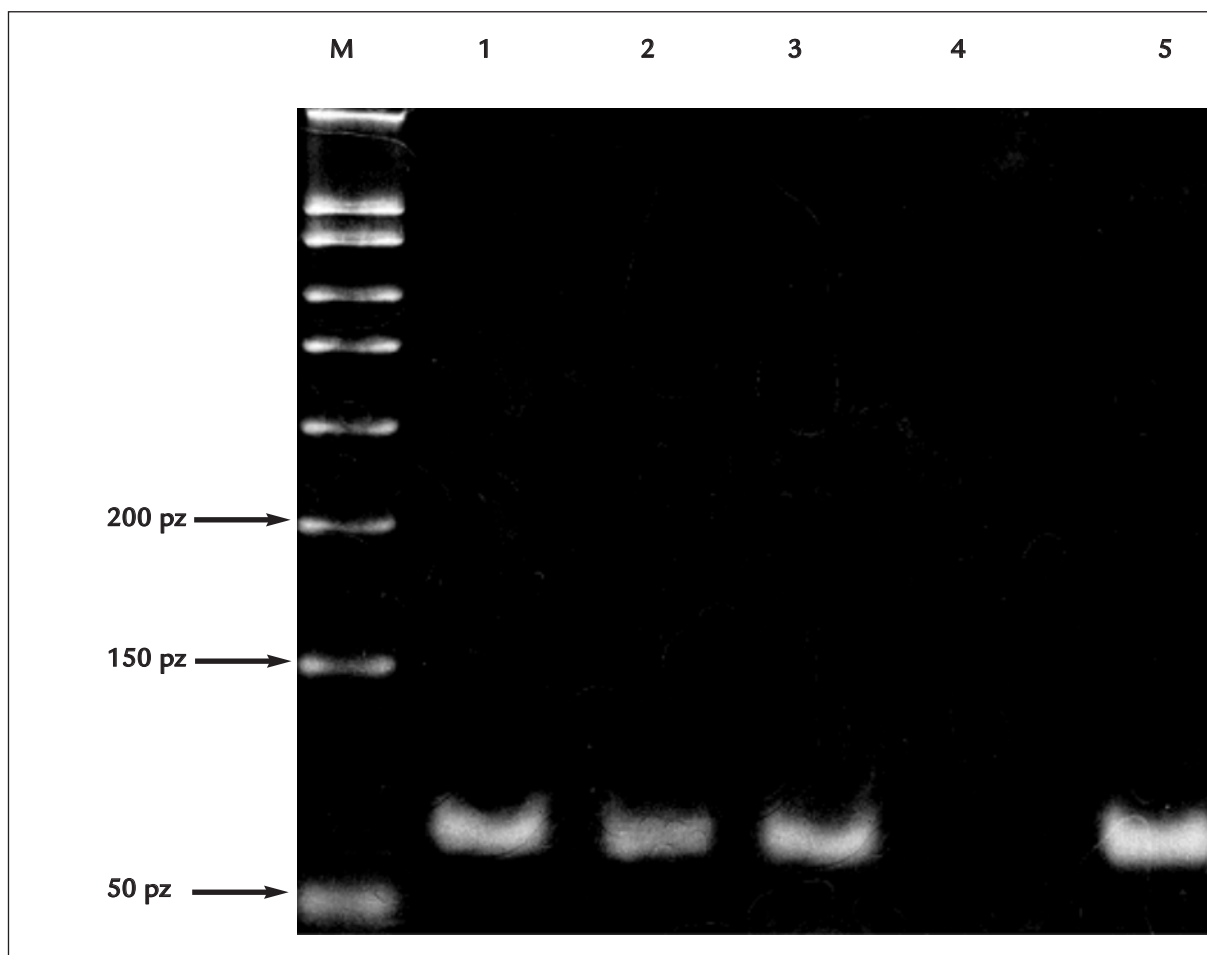
Onkogen *c-erbB2* jest zlokalizowany na ramieniu dłuższym chromosomu 17 i koduje glikoproteinę o masie 185 kD, o funkcji receptora kinazy tyrozynowej. Zwiększoną ekspresję genu *c-erbB2* stwierdza się w ok. 20–30 proc. raków sutka [1, 3, 4]. Wykazano zależność pomiędzy zaburzeniami tego onkogenu a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, wczesnymi nawrotami choroby i krótkim czasem przeżycia [6, 8].

W prezentowanych badaniach podjęto próbę określenia stopnia amplifikacji genu *c-erbB2* u kobiet chorych na raka sutka w wieku menopauzalnym. W tym celu zastosowano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR).

Materiał i metody

Pacjentki

Materiał do badań stanowiły pobrane z materiału pooperacyjnego, a następnie utrwalone w parafinie wy-



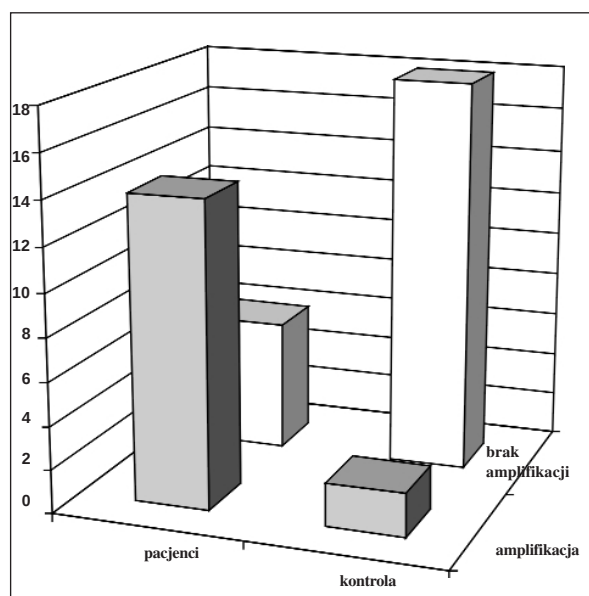
Ryc. 1. Analiza amplifikacji genu *c-erbB2* poprzez elektroforezę w 5-procentowym żelu poliakrylamidowym. Ścieżki 1, 2, 3 i 5 przedstawiają przypadki, w których stwierdzono amplifikację genu (produkt o długości 98 pz), ścieżka 4 – brak amplifikacji genu. M – marker mas cząsteczkowych (Sigma – Aldrich, Niemcy)



Tab. I. Analiza amplifikacji genu *c-erbB2* (*Her-2/neu*) u chorych na raka sutka i w grupie kontrolnej

Pacjenci (n = 20)		Kontrola (n = 20)	
Amplifikacja genu <i>Her-2/neu</i>	Brak amplifikacji genu <i>Her-2/neu</i>	Amplifikacja genu <i>Her-2/neu</i>	Brak amplifikacji genu <i>Her-2/neu</i>
14 (0,70)*	6 (0,30)	2 (0,10)	18 (0,90)

* $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną



Ryc. 2. Stopień amplifikacji genu *c-erbB2* u chorych i w grupie kontrolnej

cinki guzów piersi (n=20). Średnia wieku pacjentek wynosiła 58 lat. Grupę kontrolną stanowiły próbki krwi uzyskane od kobiet (n=20), u których nie stwierdzono występowania nowotworu.

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) do badań był izolowany przy zastosowaniu komercyjnie dostępnego zestawu OIAmp Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). W przypadku tkanek utrwalonych w parafinie przed izolowaniem DNA prowadzono ich deparafinizację ksylenem i etanolem.

Amplifikacja genu *c-erbB2*

W celu amplifikacji genu *c-erbB2* zastosowano następujące startery o sekwencjach: 5'-CCT CTG ACG TCT TCG ACC TC-3' oraz 5'- ATC TCT CTG CTG CCG TCG TCG CTT -3'. Reakcja PCR została przeprowadzona w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400 thermal cycler. Warunki reakcji PCR były następujące: 1 min w 94°C, 1 min w 60°C, 1 min w 72°C, przez 33 cykle. Mieszanina reakcyjna (25 µl) obejmowała: 30 ng genomowego DNA, 0,2 µmol każdego startera (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Niemcy), 2,5 mM

MgCl₂, 1 mM dNTPs and 1 U polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Wyniki reakcji PCR były analizowane w 5-procentowym żelu poliakrylamidowym po barwieniu bromkiem etydyny (ryc. 1.).

Wyniki

Stwierdzono znacząco wyższą częstość amplifikacji genu *c-erbB2* w grupie badanej (0,70) w porównaniu z grupą kontrolną (0,10) (tab. I.). Różnice pomiędzy obu badanymi grupami były statystycznie istotne ($p < 0,05$) (ryc. 2.).

Dyskusja

Zmiana stopnia ekspresji genu *c-erbB2* została po raz pierwszy opisana w 1988 r przez van de Vijvera i wsp. w raku sutka *in situ* [11]. Wysoka ekspresja tego genu we wczesnym stadium rozwoju nowotworu wskazywała, że może on mieć znaczenie dla jego rozwoju. Niski poziom ekspresji w zmianach łagodnych potwierdzał te przypuszczenia. W kolejnych badaniach podjęto próby określenia zależności pomiędzy zaburzeniami genu *c-erbB2* a odpowiedzią na hormono- i chemioterapię. Stwierdzono, że chorzy z guzami, w których występuje wzrost aktywności *c-erbB2* wykazują oporność na hormonoterapię, niezależnie od obecności receptorów estrogenowych. Brak było natomiast jednoznacznych wyników skuteczności chemioterapii u tych chorych [5, 8].

W analizach do oznaczania aktywności genu *c-erbB2* stosuje się technikę Southern blot, FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) oraz PCR [5, 10]. W prezentowanych badaniach podjęto próbę oznaczenia stopnia amplifikacji genu *c-erbB2* przy zastosowaniu reakcji PCR. Metoda ta wymaga małej ilości DNA, co pozwoliło na wykorzystanie w doświadczeniach oprócz krwi także próbki tkanek utrwalonych w parafinie.

Przeprowadzone badania sugerują, że zwiększona amplifikacja genu *c-erbB2* jest związana z występowaniem raka sutka u kobiet, jednakże konieczna jest analiza większej populacji dla potwierdzenia tego przypuszczenia.



Summary

Background. The *c-erbB2* (*Her2/neu*) oncogene is located on the long arm of chromosome 7, encoding for a 185 kD transmembrane glycoprotein p185 with tyrosine kinase receptor function. Several studies have shown that overexpression of *c-erbB2* (*Her-2/neu*) gene has been associated with breast cancer appearance. The aim of the present study was to investigate the relationship between amplification of *c-erbB2* gene and the appearance of breast cancer in menopausal women.

Materials and methods. Paraffin embedded tumour tissue were obtained from patients with breast cancer (n=20). Blood samples from age matched healthy women (n=20) served as control. The amplification of *c-erbB2* gene was determined by PCR reaction using the allele specific primers.

Results. The amplification of *c-erbB2* gene was significantly higher in patients compared as control ($p < 0.05$)

Conclusion. The results suggest that amplification of *c-erbB2* gene may be linked with appearance of breast cancer in menopausal women.

Key words: *c-erbB2* (*Her-2/neu*) gene, amplification, breast carcinoma, menopause, PCR

Piśmiennictwo

1. Allred DG, Clark G M, Molina R. Overexpression of *Her2/neu* and its relationship with other prognostic factor changes during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol*, 1992, 23, 974-9.
2. Brandt-Rauf P, Pincus MR. Molecular markers of carcinogenesis. *Pharmacol Ther*, 1998, 77, 135-48.
3. Liu ET, Thor AD, He M. The *Her-2* (*c-erb2*) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene*, 1992, 7, 1027-32.
4. Pechoux C, Chardonnet Y, Noel P. Immunohistochemical studies on *c-erb2* oncoprotein expression in paraffin embedded tissue in invasive and non-invasive human breast lesions. *Anticancer Res*, 1994, 14, 1343-50.
5. Persons DL, Borelli KA, Hsu PH. Quantitation of *Her2/neu* and *c-myc* gene amplification in breast carcinoma using fluorescence in situ hybridisation. *Mod Pathol*, 1997, 10, 720-7.
6. Revillon F, Bonnetterre J, Peyrat J P. *ERBB2* oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*, 1998, 34, 791-808.
7. Selim AG, El-Ayat G, Wells A.: *c-erb2* oncoprotein expression, gene amplification, and chromosome 17 aneusomy in apocrine adenosis of the breast. *J Pathol*, 2000, 191, 138-142.
8. Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, et al. J. Prognostic and predictive value of *c-erbB2* overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol*, 1998, 16, 462-9.
9. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *Her-2/neu* oncogene. *Science*, 1987, 235, 177-81.
10. Stark A, Hulka B, Joens S, Novotny D, et al. *Her-2/neu* amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol*, 2000, 18, 267-4.
11. Van de Vijver M J, Peters J L, Moor W J. *Neu*-protein overexpression in breast cancer: Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med*, 1988, 319, 1239-45.
12. Zhou D, Battifora H, Yokota J. Association of multiple copies of the *c-erb2* oncogene with spread of breast cancer. *Cancer Res*, 1987, 47, 6123-5.

Adres do korespondencji:

Zakład Patomorfologii Klinicznej,
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
Rzgowska 281/289
93-338 Łódź
tel. +48-42 271 12 80
fax +48-42 271 14 21

