

Totalna metylacja genomowego DNA w relacji do mutacji punktowych kodonu 12 genu *K-ras* w pierwotnych rakach endometrium

The correlation between genomic DNA total methylation and codon 12 K-ras gene point mutations in primary endometrial cancers

Krzysztof Postawski¹, Andrzej Semczuk¹, Roman Miturski¹, Jerzy A. Jakowicki¹, Gérard Keith², Włodzimierz Baranowski¹

Celem pracy było ustalenie zależności pomiędzy stopniem całkowitej metylacji genomowego DNA a mutacjami punktowymi w kodonie 12 genu K-ras w rakach endometrium u kobiet.

Materiał i metody stanowiło DNA uzyskane z 44 pierwotnych raków endometrium. Kontrolę stanowiły próbki DNA uzyskane z 25 prawidłowych tkanek endometrium. Zakres metylacji DNA ustalano poprzez ocenę ilościową chromatograficznych rozdzielców hydrolizatów DNA znakowanych ³²P [γATP] na końcu 5' (³²P-postlabeling). Mutacje punktowe w kodonie 12 genu K-ras oceniano techniką analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych i reakcji łańcuchowej polimerazy (RFLP-PCR).

Totalna metylacja genomowego DNA w rakach endometrium wynosiła 3,43%±0,47% i była statystycznie wyższa niż w prawidłowym endometrium fazy proliferacyjnej (2,94%±0,40%, p=0,003) ale niższa w relacji do endometrium z fazy sekrecyjnej (3,75%±0,47%, p=0,03). Mutacje punktowe kodonu 12 genu K-ras stwierdzono w 25% analizowanych raków. Metylacja genomowego DNA była statystycznie niższa w rakach wykazujących mutację kodonu 12 genu K-ras w relacji do zakresu DNA nowotworów nie wykazujących tej mutacji.

Wniosek: Hipometylacja DNA może ułatwiać powstawanie mutacji w genie K-ras.

Słowa kluczowe: metylacja DNA, rak endometrium, gen K-ras.

(Przegląd Menopauzalny 2002, 2: 14–17)

Metylacja dezoksycytosyny (dC) jest epigenetyczną i jedyną znaną dotychczas fizjologiczną modyfikacją DNA [12]. Polega ona na przyłączeniu

reszty metylowej (CH₃-) do pierścienia pirymidynowego dC w pozycji 5 [11]. Reakcję powyższą katalizują specyficzne enzymy zwane metylotransferazami

¹ II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej, kierownik: prof. zw. dr hab. med. Jerzy Jakowicki,

² Unite Propre de Recherche no 9002 Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire



5-cytozyny DNA [4, 8]. Zmiany metylacji DNA, zarówno w kierunku hipometylacji, jak i hipermetylacji są uznawane za jedno z najwcześniejszych zjawisk w onkogenezie [1]. Hipometylacja może powodować zwiększoną tendencję do mutacji i tym samym ułatwiać progresję procesu nowotworowego [3].

Ostatnio ustalono, że aktywność metylotransferazy DNA jest regulowana przez układ produktów protoonkogenów jądra komórkowego *ras* i *jun* (ang. *Ras-Jun signaling pathway*) [7, 9, 10]. Rodzina genów *ras* składa się z trzech genów *H-ras*, *N-ras* i *K-ras* [2]. Nabywają one własności onkogennych poprzez mutacje punktowe w regionach określanych jako gorące miejsca (ang. *hot spots*), występujących najczęściej w kodonach 12, 13, 59 i 61. Mutacje genu *K-ras* wykrywa się najczęściej w nowotworach typu gruczolakoraków w trzustce, okrężnicy, płucach i endometrium [2].

W dotychczas opublikowanych pracach brak jest danych na temat relacji pomiędzy mutacjami w genach rodziny *ras* a zakresem globalnej metylacji DNA.

Celem pracy było ustalenie ewentualnego związku pomiędzy mutacjami w kodonie 12 genu *K-ras* a zakresem metylacji totalnego genomowego DNA w rakach endometrium.

Materiał i metody

Próbki raka endometrium uzyskano od 44 pacjentek operowanych w II Katedrze i Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie. Średni wiek operowanych wyniósł $60,1 \pm 9,5$ lat (zakres od 38–81 lat). Histologicznie prawidłowe tkanki endometrium z fazy proliferacyjnej i fazy sekrecyjnej, służące jako kontrola uzyskano od 25 pacjentek operowanych z powodu innego niż patologia błony śluzowej macicy. Pacjentki z tej grupy wykazywały prawidłowy cykl miesięczny.

Próbki DNA w ilości 1 µg poddawano trawieniu do 3' monofosfonukleozydów za pomocą nukleazy mikrokowej (2 µg) i fosfodiesterazy śledzionowej (1 µg) (Sigma-Aldrich) w buforze zawierającym 20 mM bursztynianu sodu pH 6 z dodatkiem 10 mM CaCl_2 . Po trawieniu roztwór dopełniano wodą destylowaną do 60 µl i z tej próbki pobierano do znakowania 10 µl roztworu co odpowiada 0,17 µg DNA. Próbki liofilizowano, a następnie dodawano 5 µl buforu bicinga – HCl pH 9,25 zawierającego 2 µCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (Amersham, USA), 400 pM nieznakowanego ATP i 2 U kinazy polinukleotydowej (pK) (Sigma-Aldrich). Znakowanie przeprowadzono w łaźni wodnej w temp. 37°C przez 30 min. Do każdej z pro-

bówek zawierającej mieszaninę 3', 5' dwufosforanów nukleozydów znakowanych ^{32}P na końcu 5', dodawano 4 mU apyrazy (Sigma-Aldrich) w celu strawienia nadmiaru ATP. Reakcję powyższą przeprowadzano w temperaturze pokojowej w czasie 20 min. Uzyskane w reakcji znakowania dwufosforany dezoksynukleotydów poddawano defosforylacji w pozycji 3' przy udziale 0,1 µg nukleazy P_1 (Boehringer, Niemcy) w temp. 37°C w 5 µl buforu zawierającego 0,5 M octan amonu ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) pH 4,5.

Próbki hydrolizatu w objętości 5 µl nanoszono punktowo na płytki celulozowe o wymiarach 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Niemcy) i poddawano 2-kierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Rozdział chromatograficzny w pierwszym kierunku przeprowadzano stosując rozpuszczalnik o następującym składzie: kwas izomasłowy: H_2O : NH_4OH (66:17:1 – v/v/v). Czas rozdziału w pierwszym kierunku monitorowano obserwując migrację solwentu – rozdział kończono w momencie osiągnięcia przez solwent górnej krawędzi płytki. Średni czas rozdziału wynosił 12–14 godz. Po wysuszeniu płytek w temperaturze pokojowej (ok. 6–8 godz.) przystępowano do rozdziału w drugim kierunku, stosując solwent o następującym składzie: 0,1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,8; siarczan amonu: propanol – 1 (100:60:1,5 – v/w/v). Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego płytki umieszczano w cieplarni i suszono w temp. 52°C co najmniej przez 2 godz. Pomiary ilościowe radioaktywności znakowanych plamek zawierających metylo-5-dezoksycytydynę (pm5dC) i dezoksycytydynę (pdC) przeprowadzano 2-krotnie przy pomocy analizatora (*bio-imaging*) (BAS 2000, Fuji, Japonia) w trybie ilościowym. Zawartość m⁵dC obliczano ze wzoru $(\text{m}^5\text{dC}/\text{m}^5\text{dC} + \text{dC}) \times 100\%$.

Analizę mutacji kodonu 12 w genie *K-ras* analizowano metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych i reakcji łańcuchowej polimerazy (RFLP-PCR) zgodnie z metodą opisaną przez Jiang i wsp. [6]. W skrócie używając specyficznych primerów amplifikowano 157-nukleotydowe fragmenty pierwszego exonu genu *K-ras*, które poddawano enzymatycznemu trawieniu endonukleazą restrykcyjną BstNI. W rozdziale elektroforetycznym na 10% żelu poliakrylamidowym w przypadku braku mutacji (*typ dziki*) uzyskiwano 3 fragmenty (odpowiednio o długości 114pz, 29pz i 14pz). W przypadku obecności mutacji w rozdziale elektroforetycznym występowały jedynie 2 prążki o długości 143pz i 14pz. Jako kontrolę pozytywną używano DNA ze zmutowanych komórek raka endometrium, uzyskanych z hodowli komórkowej, zaś jako kontrola negatywna służył DNA uzyskany z łożyska człowieka.



Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonywano przy pomocy pakietu Statistica 5, stosując test *t-Studenta*. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe. Istotność różnic oceniano w oparciu o $p < 0,05$.

Wyniki

Totalna metylacja genomowego DNA w rakach endometrium wynosiła $3,43\% \pm 0,47\%$ i była statystycznie wyższa niż w prawidłowym endometrium fazy proliferacyjnej ($2,94\% \pm 0,40\%$, $p=0,003$) ale niższa w relacji do endometrium z fazy sekrecyjnej ($3,75\% \pm 0,47\%$, $p=0,03$). Mutacje punktowe kodonu 12 genu *K-ras* stwierdzono w 25% analizowanych raków. Metylacja genomowego DNA była statystycznie niższa w nowotworach wykazujących mutację kodonu 12 genu *K-ras* w relacji do zakresu DNA guzów nie wykazujących tej mutacji ($3,19\% \pm 0,31\%$ versus $3,51\% \pm 0,48\%$, $p=0,047$). Zakres metylacji DNA w prawidłowym endometrium fazy proliferacyjnej, w relacji do zakresu metylacji DNA raków endometrium wykazujących mutacje w zakresie kodonu 12 genu *K-ras* nie wykazywał istotnych statystycznie różnic. Istotna różnica występowała natomiast w przypadku endometrium fazy sekrecyjnej w relacji do raków endometrium z mutacją genu *K-ras*, gdzie stwierdzono istotnie niższy zakres metylacji w DNA tkanki guza ($p=0,0024$). W przypadku nowotworów bez mutacji metylacja DNA guza była statystycznie wyższa w relacji do endometrium fazy proliferacyjnej ($p=0,0012$) i bardzo zbliżona do zakresu metylacji DNA w endometrium fazy sekrecyjnej.

Dyskusja

Przeprowadzone przez nas badania pokazały, że zakres metylacji genomowego DNA w pierwotnych rakach endometrium mieści się najczęściej w granicach metylacji prawidłowego endometrium kobiet w okresie rozrodczym. Jedynie 6 guzów nowotworowych wykazywało wartości metylacji DNA poniżej wartości uzyskiwanych dla prawidłowego endometrium. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań wskazują na fakt, że w przypadku raków endometrium nie obserwuje się hipometylacji jako czynnika promującego onkogenezę. Stwierdzono nawet, że w przypadku raków endometrium, hipermetylacja jest częstszym zjawiskiem molekularnym niż hipometylacja.

W naszych badaniach po raz pierwszy stwierdzono, że istnieje korelacja pomiędzy obecnością muta-

cji w kodonie 12 genu *K-ras* a zakresem metylacji DNA. Mutacja genu *K-ras* uznana za wczesny etap uszkodzenia molekularnego w onkogenezie jest silnie skorelowana z hipometylacją DNA. Uzyskane przez nas rezultaty wskazują na hipometylację DNA jako mechanizm ułatwiający (promujący?) powstawanie mutacji. W zestawieniu z faktem gorszego rokowania dla pacjentek w przypadku obecności mutacji w genie *K-ras* [5] wydaje się wysoce prawdopodobne, że ocena metylacji DNA może stanowić komplementarny marker prognostyczny raków endometrium. W badanej przez nas grupie, u pacjentek, u których stwierdzono najniższy poziom metylacji DNA i mutację genu *K-ras* wystąpiła wznova nowotworu i umarły one w pierwszym roku po operacji. Pozostałe kobiety, wykazujące poziomy metylacji DNA z operowanych guzów z zakresie wartości średnich, mimo stwierdzenia mutacji w genie *K-ras* nie wykazują wznovy procesu nowotworowego; niektóre z nich nawet 5 lat po operacji.

Prezentowane badania w nowotworach złośliwych endometrium są też potwierdzeniem opinii grupy Szyfa [7, 9, 10], że metylacja DNA może być regulowana przez geny rodziny *ras*. W opinii wspomnianego zespołu zmiany metylacji DNA mogą być wywoływane przez modulację aktywności promotora *DNMT1*, albo przez wzbudzenie globalnej demetylacji, której mechanizm jest dotychczas niejasny. Transaktywacja genu metylotransferazy spowodowana jest zależną od białka *ras* fosforylacją protoonkogenu jądrowego *c-Jun*, który oddziałując następnie na miejsca AP-1 zlokalizowane w promotorze metylotransferazy 5-cytosyny DNA wywołuje wzrost transkrypcji genu. Szyf i wsp. [10] stwierdzili ponadto, że frakcje jądrowe komórek embrionalnych myszy (P19) transfekowanych protoonkogenem *v-Ha-Ras* wywołują demetylację dwuniciowych konstruktów DNA zbudowanych z oligonukleotydów m^5dCpdG .

W świetle wyników przeprowadzonych badań wydaje się racjonalne uznać fakt, że w rakach endometrium z mutacją genu *K-ras* istnieje korelacja pomiędzy drogą przenoszenia sygnałów proliferacyjnych typu *ras* a zakresem metylacji DNA. W przypadku raków nie wykazujących obecności mutacji genu *K-ras* powinny być brane pod uwagę inne mechanizmy regulujące zakres metylacji DNA.

Praca powstała w ramach realizacji grantów Akademii Medycznej w Lublinie (DS 121/01 – W.B., PW 149/01 – K.P.) oraz Ligue National Contre le Cancer, Comitee du Haut Rhin, France – G.K., K.P., W.B.



Summary

Materials and methods: We analyzed the methyldeoxycytosine (m^5dC) and the deoxycytosine content of genomic DNAs isolated from 44 primary endometrial cancers and 25 normal endometrium samples using enzymatic digestion into nucleotides, ^{32}P postlabeling, two-dimensional thin-layer chromatography on cellulose plates and bioimaging.

Results: The overall m^5dC of the uterine cancer DNAs ($3.43\% \pm 0.47\%$) was significantly higher than that of the normal proliferative endometrium ($2.94\% \pm 0.4\%$, $p=0.003$) and lower than that of the secretory endometrium DNAs ($3.75\% \pm 0.47\%$, $p=0.03$). In addition, RFLP-PCR revealed K-ras gene point mutations in 25% (11 cases) of the cancers. The m^5dC of neoplasms with mutant K-ras was lower than that of cancers bearing the wild-type gene ($3.19\% \pm 0.31\%$ vs. $3.51\% \pm 0.48\%$, $p=0.047$). Among all endometrial cancer DNAs six were found to be hypomethylated, eight were hypermethylated, whereas the remaining 30 had m^5dC within range of normal endometrium. Lower level of DNA methylation seemed to be associated with diminished tumor invasiveness. K-ras gene alterations were absent in all hypermethylated cancer DNAs.

Conclusions: Our results suggest that alterations in overall DNA methylation seem to be a result of neoplastic transformation and could therefore be used as a prognostic molecular marker of endometrial cancer. DNA hypomethylation may facilitate the mutability of the K-ras gene.

Key words: DNA methylation, endometrial cancer, K-ras gene.

Piśmiennictwo:

1. Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa J-PJ. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4045-0.
2. Bos JL. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-9.
3. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, et al. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89-93.
4. Hsu DW, Lin MJ, Lee TL, et al. Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9751-6.
5. Ito K, Watanabe K, Nasim S, et al. K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 238-46.
6. Jiang W, Kahn SM, Guillem JC, et al. Rapid detection of *ras* oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 1989; 4: 923-8.
7. MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1995; 270: 11327-37.
8. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.
9. Rouleau J, MacLeod AR, Szyf M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1995; 270: 1595-601.
10. Szyf M, Theberge J, Bozovic V. Ras induces a general DNA demethylation activity in mouse embryonal P19 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 12690-6.
11. Wu JC, Santi DV. Kinetic and catalytic mechanism of *HhaI* methyl-transferase. *J Biol Chem* 1987; 262: 778-86.
12. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18: 869-82.

Adres do korespondencji

II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej
20-954 Lublin
ul. Jaczewskiego 8
wbaranowski@yahoo.com

