

Analiza markerów niestabilności mikrosatelitarnej u kobiet z rakiem endometrium

Analysis of microsatellite instability markers in women with endometrial cancer

Grażyna Dec¹, Hanna Romanowicz-Makowska², Beata Smolarz², Andrzej Kulig²

Cel: Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) odgrywa ważną rolę w rozwoju raka endometrium. Celem pracy było określenie niestabilności mikrosatelitarnej w grupie 10 kobiet w wieku pomenopauzalnym z rakiem endometrium.

Materiały i metody: Materiał do badań stanowiły wycinki z guza oraz krew pobrane od tej samej pacjentki. Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej (n=25). MSI została określona przy zastosowaniu panelu 5 markerów mikrosatelitarnych dla jednonukleotydowych i dwunukleotydowych sekwencji powtórzonych: BAT 25 (locus 4q12), BAT 26 (2p16), D2S123 (2p16-p21), D5S346 (5q21-q22) i D17S250 (17q11.2-q12).

Wyniki i wnioski: Nie stwierdzono różnic w częstości niestabilności mikrosatelitarnych pomiędzy próbkami krwi a guzem uzyskanych od tej samej pacjentki. Stopień niestabilności mikrosatelitarnej był znacząco wyższy u chorych na raka endometrium [4/10 (40%)] w porównaniu z grupą kontrolną [3/25 (12%)] ($p < 0,05$). Wyniki sugerują, że niestabilność mikrosatelitarna wydaje się istotna dla rozwoju raka endometrium.

Słowa kluczowe: rak endometrium, markery niestabilności mikrosatelitarnej, PCR

(Przegląd Menopauzalny 2004; 5: 14–18)

Wstęp

Zaburzenia w sekwencjach mikrosatelitarnych wykryto w genomie komórek rakowych, w tym raka trzonu macicy. Za zmiany te, określane mianem niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych (MSI – ang. *microsatellite instability*), jest odpowiedzialny uogólniony defekt mechanizmów odpowiadających za wierność replikacji DNA lub za poreplikacyjną naprawę DNA [1]. Sekwencje mikrosatelitarne są szczególnie podatne na błędy w replikacji i zaburzenia wykryte w ich obrębie są markerem zahamowania czynności

genów mutatorowych. Do tej pory wykryto mutacje w następujących genach: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1* i *PMS2*. Najczęściej występują one w genie *MLH1*.

Dane literaturowe wskazują, że MSI odgrywa ważną rolę w rozwoju różnych nowotworów [2–4] w tym raka endometrium [5–8].

Rak endometrium należy do najczęstszych nowotworów złośliwych rozwijających się w trzonie macicy [9]. Rak błony śluzowej trzonu macicy występuje w 80% w okresie pomenopauzalnym. Tylko 5% zachorowań na ten nowotwór notuje się przed 40. rokiem życia. Nowotwór ten zajmuje 4. miejsce wśród zachorowań na raka

¹Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;

kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

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



Tab. I. Sekwencje starterów

Marker	Sekwencje starterów	Warunki reakcji PCR
BAT25	TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT TCT GGA TTT TAA CTA TGG CTC	28 cykli 95°C przez 1 min, 56°C przez 45 s, 72°C przez 45 s
BAT26	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC	32 cykle 95°C przez 45 s, 55°C przez 1 min, 72°C przez 30 s
D2S123	AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	35 cykli 95°C przez 45 s, 55°C przez 45 s, 72°C przez 45 s
D5S346	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG AGC AGA TAA GAC AAG TAT TAC TAG	30 cykli 95°C przez 1 min, 57°C przez 45s, 72°C przez 45s
D17S250	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	35 cykli 95°C przez 45 s, 55°C przez 45 s, 72°C przez 45 s

u kobiet [10]. Rocznie odnotowuje się na całym świecie ok. 150 tys. nowych zachorowań na raka endometrium.

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) po raz pierwszy została wykryta u rodzin z zespołem HNPCC (ang. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) [11, 12]. Za jej powstawanie odpowiedzialny jest defekt w genach naprawczych. W 90% przypadków HNPCC mutacje germinalne mają miejsce w genach *MSH2* i *MLH1* [13]. Jednym z częściej występujących nowotworów w koïncydencji z rakiem jelita grubego jest rak endometrium. W genomie jego komórek dochodzi często do MSI pod wpływem uszkodzeń w genach mutatorowych [14, 15]. Poza tym wiadomo, że niestabilność mikrosatelitarną spotyka się w 9–45% sporadycznych przypadków raka trzonu macicy [16, 17]. W prezentowanej pracy przeprowadzono analizę genetyczną niestabilności mikrosatelitarnych u chorych na raka endometrium. W celu analizy MSI zastosowano panel 5 markerów (wg kryterium Bethesda) [18]; 2 jednonukleotydomowe powtórzenia (BAT25 i BAT26) oraz 3 dwunukleotydomowe powtórzenia (D2S123, D5S346 i D17S250).

Materiały i metody

Pacjentki

Badaniom poddano kobiety (n=10) w wieku od 55 do 82 lat (średnia wieku \pm SD 68,8 \pm 6,68 lat), u których stwierdzono raka endometrium. Materiał do badań w postaci próbek krwi pobranej na cytrynian oraz wycinków z guza endometrium został uzyskany od każdej pacjentki. Wszystkie nowotwory sklasyfikowano wg kryteriów ustalonych przez FIGO (ang. *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*).

Grupa kontrolna

Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet (n=25), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej.

Izolacja DNA

DNA był izolowany z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu QIAmp Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta.

Analiza niestabilności mikrosatelitarnych

Próbki genomowego DNA uzyskane od kobiet z rakiem endometrium i kontrolnego DNA zostały poddane analizie z zastosowaniem panelu 5 markerów mikrosatelitarnych dla jednonukleotydomowych i dwunukleotydomowych sekwencji powtórzonych: BAT 25 (*locus* 4q12), BAT 26 (2p16), D2S123 (2p16–p21), D5S346 (5q21–q22) and D17S250 (17q11.2–q12) [18]. Wszystkie sekwencje starterów uzyskano z komputerowej bazy danych Genome DataBase (GDB, at: <http://www.gdb.org>). Warunki reakcji PCR podano w tab. I.

Reakcja PCR została przeprowadzona w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400. Mieszanina reakcyjna (25 μ l) obejmowała 5 ng genomowego DNA, 0,2 μ mol każdego startera (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Niemcy), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP i 1 U Taq Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Produkt PCR podlegał elektroforezie denaturującej w 8% żelu poliakrylamidowym i był wizualizowany przez barwienie srebrem. Pacjentki, których próbki DNA wykazywały allele, które nie były obecne w kontrolnym DNA, były klasyfikowane jako MSI pozytywne.

Analiza statystyczna

W celu analizy statystycznej zastosowano test χ^2 , $p < 0,05$ traktowano jako wynik statystycznie znaczący.

Wyniki

Próbka była klasyfikowana jako przypadek o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej [ang.



Tab. II. Liczba przypadków niestabilności mikrosatelitarnej u kobiet z rakiem endometrium w porównaniu z kontrolą

Pacjentki z rakiem endometrium (n=10)					
Markery MSI wg kryteriów Bethesda					
MSS	MSI+				
	MSI-L	MSI-H			
markery pozytywne [0]	markery pozytywne [1]	markery pozytywne [2]	markery pozytywne [3]	markery pozytywne [4]	markery pozytywne [5]
n=6 (0,60) *	n=1 (0,10)	n=0	n=1 (0,10%)	n=0	n=2 (0,20%)
Kontrola (n=25)					
Markery MSI wg kryteriów Bethesda					
markery pozytywne [0]	markery pozytywne [1]	markery pozytywne [2]	markery pozytywne [3]	markery pozytywne [4]	markery pozytywne [5]
n=22 (0,88) *	n=2 (0,08)	n=1 (0,04)	n=0	n=0	n=0

* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą

MSI-H – wysoki stopień MSI; MSS – brak niestabilności; MSI-L – niski stopień MSI

MSI-high, (MSI-H)] jeśli 2 lub więcej markerów wykazywało niestabilność, natomiast o niskim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej [ang. *MSI-low* (MSI-L)] jeśli 1 marker wykazywał niestabilność w porównaniu z kontrolnym DNA. Próbki, w których nie stwierdzono niestabilności mikrosatelitarnej definiowano jako MSI stabilne [ang. *MS-stable* (MSS)].

Przebadano 10 pacjentek z rakiem endometrium oraz 25 kobiet z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic w niestabilności mikrosatelitarnej pomiędzy próbkami DNA uzyskanymi z guza a próbkami DNA z krwi pochodzącymi od tej samej pacjentki. 4 z 10 pacjentek (40%) wykazywało niestabilność mikrosatelitarną przy zastosowaniu pełnego panelu 5 markerów; 3 pacjentki zostały zaklasyfikowane jako przypadki o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej, a 1 pacjentka (10%) jako przypadek niskiego stopnia niestabilności (tab. II).

Wykazano, że obecność MSI u chorych na raka endometrium jest wyższa niż w grupie kontrolnej (ryc. 1.) ($p < 0,05$).

Dyskusja

Proces powstawania raka endometrium jest wynikiem akumulacji wielu zmian genetycznych [19]. Wiadomo, że w procesie nowotworzenia biorą udział 3 główne grupy genów onkogeny, geny supresorowe oraz geny mutatorowe (geny kodujące enzymy, kontrolujące wierność replikacji i naprawy DNA). W warunkach prawidłowych podlegają one kontrolowanej ekspresji podczas embriogenezy, różnicowania i proliferacji komórek, natomiast ich mutacje prowadzą do zabu-

żenia tych procesów i w konsekwencji do transformacji nowotworowej.

Defekty w funkcjonowaniu genów mutatorowych prowadzą do powstawania niestabilności mikrosatelitarnych, które przyczyniają się do rozwoju raka endometrium [20–24].

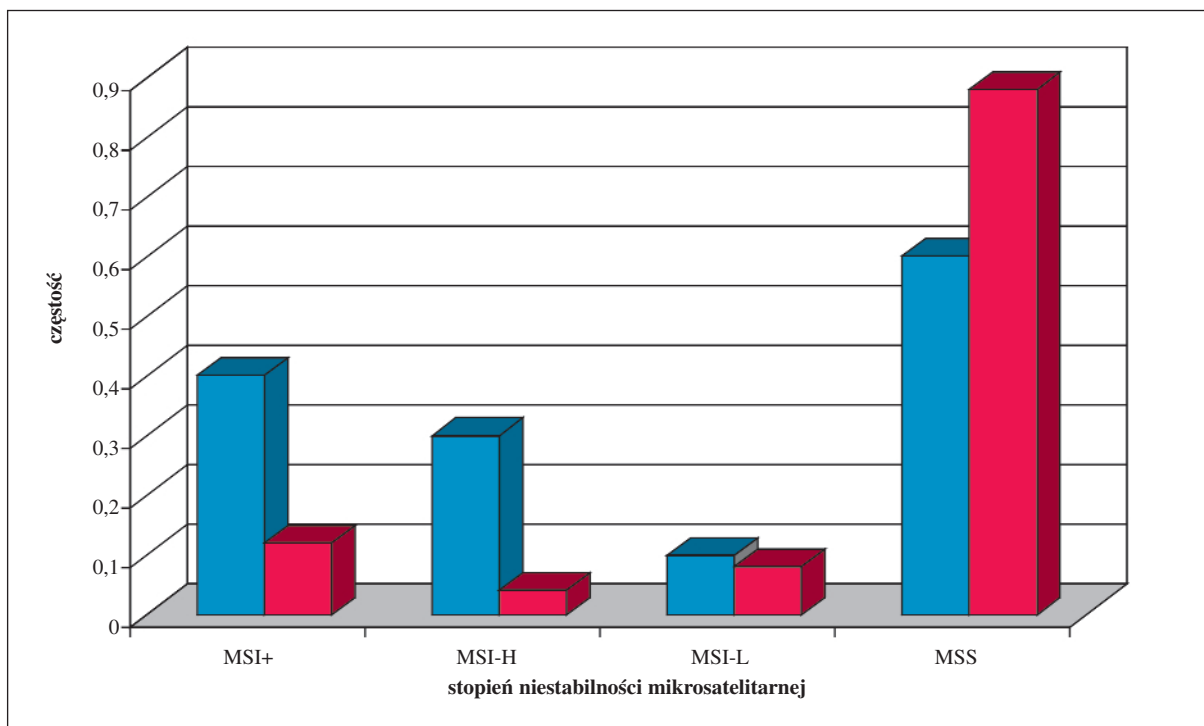
Badania wskazują, że MSI może być markerem tendencji do powstawania błędów replikacyjnych w nowotworach [8, 22, 25]. Uszkodzenia w genach naprawczych, takich jak *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* powodują błędy replikacyjne, ujawniające się jako niestabilność markerów mikrosatelitarnych. Wykazano, że utrata ekspresji genu *MLH1* jest częstym zjawiskiem w raku endometrium [26–28]. W nowotworach endometrium o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej stwierdzono utratę ekspresji genu *MLH1*, w przeciwieństwie do nowotworów z niskim stopniem MSI. Ponieważ patologiczna ekspresja genu *MLH1* nie występuje we wszystkich nowotworach z pozytywnym indeksem MSI, sugeruje to, że w tym procesie mogą uczestniczyć inne geny naprawcze [28].

W prezentowanej pracy wykazano związek pomiędzy występowaniem raka endometrium a obecnością MSI. 40% chorych wykazywało MSI, w przeciwieństwie do 12% kontroli.

Badania genetyczne wskazują, że zmiany genetyczne, takie jak mutacje *p53*, utrata heterozygotyczności LOH, czy zaburzenia amplifikacji genów *K-ras*, *PTEN* oraz *Her2/neu* są wykrywane w raku endometrium [29]. Nasze badania potwierdziły fakt, że MSI może występować jako częste zjawisko w przypadku tego nowotworu.

Wysoka częstość MSI u kobiet z rakiem endometrium dostarcza motywu do jej zastosowania jako mar-





Ryc. 1. Niestabilność mikrosatelitarna w grupie chorych na raka endometrium w porównaniu z kontrolą. Kolor niebieski – pacjentki z rakiem endometrium, kolor czerwony – kontrola

kerą wykrywania grupy wysokiego ryzyka wystąpienia raka endometrium. Kolejne badania, które obejmują większą grupę badaną są konieczne do potwierdzenia tego przypuszczenia.

Praca powstała w oparciu o grant nr 6P05E12220 uzyskany z Komitetu Badań Naukowych (KBN).

Summary

Purpose: Microsatellite instability (MSI) play important role for the development of endometrial cancer. The aim of this study was evaluation of microsatellite instability in 10 postmenopausal women with endometrial cancer.

Materials and methods: Cancer tissue and blood were obtained from the same patients. Blood samples from age matched healthy women served as control (n=25). MSI was studied at five loci containing single- or dinucleotide repeat sequences and mapping to different chromosomal locations: BAT-25 (at locus 4q12), BAT-26 (2p16), D2S123 (2p16-p21), D5S346 (5q21-q22) and D17S250 (17q11.2-q12).

Results and conclusion: No differences in the MSI frequencies between blood and cancer tissue obtained from patients were detected. The microsatellite instability status was significantly higher in endometrial cancer tissue [4/10 (40%)] compared as control [3/25 (12%)] (p<0.05).

The results suggest that the microsatellite instability seems to be important in the development sporadic endometrial cancer.

Key words: endometrial cancer, microsatellite instability markers, PCR

Piśmiennictwo

1. Lothe RA. Microsatellite instability in human solid tumours. Mol Med Today 1997; 3, 61-8.
2. Benachou N, Guiral S, Gorska-Flipot I, et al. Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. Br J Cancer 1999; 79: 1012-7.



3. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. *Science* 1993; 260: 816-9.
4. Pinto M, Oliveira C, Machado JC, et al. *MSI-L gastric carcinomas share the hMLH1 methylation status of MSI-H carcinomas but not their clinicopathological profile*. *Lab Invest* 2000; 80: 1915-23.
5. Chadwick RB, Pyatt RE, Niemann TH, et al. *Hereditary and somatic DNA mismatch repair gene mutations in sporadic endometrial carcinoma*. *J Med Genet* 2001; 38: 461-6.
6. Furlan D, Casati B, Cerutti R, et al. *Genetic progression in sporadic endometrial and gastrointestinal cancers with high microsatellite instability*. *J Pathol* 2002; 197: 603-9.
7. Muresu R, Sini MC, Cossu A, et al. *Chromosomal abnormalities and microsatellite instability in sporadic endometrial cancer*. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1802-9.
8. Stefansson I, Akslen LA, MacDonald N, et al. *Loss of hMSH2 and hMSH6 expression is frequent in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability: a population-based study*. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 138-43.
9. Rose PG. *Endometrial carcinoma*. *N Engl J Med* 1996; 335: 610-9.
10. Bremond A, Bataillard A, Thomas L. *Cancer of the endometrium. French National Federation of Cancer (FNCLCC)*. *Br J Cancer* 2001; 84: 31-6.
11. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. *Nature* 1993; 363: 558-61.
12. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA. *Microsatellite instability is associated with tumours that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome*. *Cancer Res* 1993; 53: 5853-5.
13. Peltomaki P, Vasen HF. *Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*. *Gastroenterology* 1997; 113: 1146-58.
14. Muresu R, Sini MC, Cossu A. *Chromosomal abnormalities and microsatellite instability in sporadic endometrial cancer*. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1802-9.
15. Orbo A, Eklo K, Kopp M. *A semiautomated test for microsatellite instability and its significance for the prognosis of sporadic endometrial cancer in northern Norway*. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21: 27-33.
16. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman M. *Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma*. *Am J Pathol* 1996; 148: 1671-8.
17. Gurin CC, Federici MG, Kang L. *Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Cancer Res* 1999; 59: 462-6.
18. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR. *National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257.
19. Mutter GL. *Diagnosis of premalignant endometrial disease*. *J Clin Pathol* 2002; 55: 326-31.
20. Arzimanoglou IJ, Gilbert F, Barber HRK. *Microsatellite instability in human solid tumors*. *Cancer* 1998; 82: 1808-20.
21. Katabuchi H, van Rees B, Lambers AR, et al. *Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas*. *Cancer Res* 1995; 55: 5556-60.
22. Parc YR, Halling KC, Burgart LJ, et al. *Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in young endometrial carcinoma patients: associations with family history and histopathology*. *Int J Cancer* 2000; 86: 60-6.
23. Liu VW, Yang HJ, Wang Y, et al. *High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas*. *Br J Cancer* 2003; 89: 697-701.
24. Hardisson D, Moreno-Bueno G, Sanchez L, et al. *Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability*. *Mod Pathol* 2003; 16: 1148-58.
25. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, et al. *Genetic pathways in colorectal and other cancers*. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1986-2002.
26. Gurin CC, Federici MG, Kang L, et al. *Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Cancer Res* 1999; 59: 462-6.
27. Esteller M, Levine R, Baylin SB, et al. *MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas*. *Oncogene* 1998; 17: 2413-7.
28. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, et al. *Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinoma*. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3607-13.
29. Lax SF. *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification*. *Virchows Arch* 2004; 4: 213-23.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Hanna Romanowicz-Makowska**
 Pracownia Biologii Molekularnej
 Zakład Patomorfologii Klinicznej
 Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki
 ul. Rzgowska 281/289
 93-338 Łódź
 tel. +48 42 271 12 80

