

Badanie genetyczne apoptozy i mutacji genu BRCA1 u kobiet obciążonych dziedzicznie rakiem piersi

Genetics research of apoptosis and BRCA1 gene mutations in patients from family with hereditary breast cancer

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Elżbieta Kozłowska¹, Marek Zadrozny², Bogusław Westfal², Tomasz Stetkiewicz³, Andrzej Kulig¹, Tomasz Pertyński³

***Cel:** Ryzyko wystąpienia raka piersi może być związane z wystąpieniem mutacji w genach związanych z rozwojem nowotworów dziedzicznych. Poza tym apoptotyczna śmierć komórek odgrywa istotną rolę w patogenezie i progresji tego nowotworu. Celem pracy było określenie apoptozy i częstości mutacji w genie BRCA1 u pacjentek obciążonych dziedzicznie rakiem piersi.*

***Materiały i metody:** W badaniach uczestniczyło 30 kobiet obciążonych dziedzicznie rakiem piersi i 30 osób z grupy kontrolnej. Osoby uczestniczące w badaniach wyraziły zgodę na pobranie krwi do badań genetycznych i wypełniały ankietę, podając dane dotyczące historii chorób w poszczególnych pokoleniach.*

***Wyniki:** Spośród 30 badanych przypadków, 11 (lub 37%) wykazywało zmiany apoptotyczne w porównaniu z 13% z grupy kontrolnej. W próbkach o pozytywnym indeksie apoptotycznym zidentyfikowano jedną mutację Ex20insC i dwie mutacje ExIII7delA w genie BRCA1.*

***Wniosek:** Zmiany genetyczne wydają się być czynnikiem ryzyka raka piersi u kobiet należących do rodzin obciążonych dziedzicznie tym nowotworem. Brak mutacji w większości badanych przypadków wskazuje na fakt istnienia innych niezidentyfikowanych jeszcze genów predysponujących do tej choroby.*

***Słowa kluczowe:** rak piersi, gen BRCA1, apoptoza, PCR*

(Przegląd Menopauzalny 2004; 5: 19–23)

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

²Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Sutka Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: dr n. med. Marek Zadrozny

³Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński



Wstęp

Fakt występowania rodzinnej, dziedzicznej autosomalnie dominująco predyspozycji do raka piersi skłonił do prowadzenia badań genetycznych, dotyczących tzw. sprzężeń pomiędzy występowaniem określonych markerów genetycznych (fragmentów polimorficznych DNA) a pojawieniem się choroby nowotworowej sutka lub jajnika u członków tych rodzin. Intensywne badania tej, stosunkowo niewielkiej grupy rodzin z dziedziczną predyspozycją do raka piersi, doprowadziły do ważnych odkryć, dotyczących podłoża genetycznego tej choroby [1].

Obecnie uważa się, że mutacje genu BRCA1 występują w 75% rodzin, w których występują zarówno raki sutka, jak i raki jajnika, oraz w 50% rodzin, w których występuje wyłącznie rak piersi [2]. W ostatnich latach wzrosło także zainteresowanie apoptozą, jako istotnym czynnikiem przyczyniającym się do powstawania i rozwoju raka piersi [3, 4]. Dane literaturowe wskazują, że proces apoptozy zachodzi bardzo często w przypadku tego nowotworu [5–8].

Niedawno nastąpił rozwój testów laboratoryjnych umożliwiających wykrycie genetycznych predyspozycji do rozwoju raka piersi. Wprowadzenie tych badań na szeroką skalę będzie miało znaczący wpływ na dotychczasową profilaktykę onkologiczną, zmierzającą do wczesnego wykrywania i leczenia tego nowotworu. Uważa się, że każda kobieta pochodząca z rodziny o podwyższonym ryzyku wystąpienia raka sutka powinna być o tym poinformowana i zaznajomiona z koniecznością wykonania odpowiednich badań. Według Lyncha kobiety te powinny rozpocząć samobadanie piersi już w wieku kilkunastu lat, a od 20. roku życia badanie piersi powinien wykonywać co pół roku lekarz. W wieku 25 lat muszą rozpocząć badania ultrasonograficzne piersi, powtarzane co 6 mies., a następnie także USG narządu rodowego. Począwszy od 35. roku życia powinny raz do roku wykonywać kontrolną mammografię. Jeżeli dojdzie do wykrycia raka w stadium I lub II, zabieg operacyjny w przypadku nosicielek uszkodzonych genów BRCA nie może być oszczędzający – zaleca się obustronną amputację piersi.

Najważniejszym efektem badań molekularnych rodzin z genetyczną predyspozycją do raka piersi jest wyłonienie osób wysokiego ryzyka, u których dzięki systematycznym badaniom profilaktycznym będzie można wykrywać wczesne postacie raka.

W obecnej pracy badano, czy obecność zmian apoptotycznych i mutacji w genie BRCA1 u kobiet z rodzin obciążonych dziedzicznie rakiem piersi może być czynnikiem ryzyka jego wystąpienia.

Materiały i metody

Pacjentki

Krew do badań została uzyskana od 30 kobiet z rodzin obciążonych dziedzicznie rakiem piersi. Wszyst-

kie pacjentki zgłaszały się do Onkologicznej Poradni Genetycznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Osoby uczestniczące w badaniach wyrażały zgodę na pobranie krwi do badań genetycznych i wypełniały ankietę, podając dane dotyczące historii chorób w poszczególnych pokoleniach.

Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od zdrowych osób ($n=30$), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej w żadnym pokoleniu.

Analiza apoptozy

Genomowy DNA był izolowany z limfocytów krwi obwodowej pobieranej na cytrynian. Krew była traktowana roztworem lizującym (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 i 1 mM EDTA, pH 7,4) a następnie buforem ekstrahującym (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS i 0,1 mg/ml proteinaza K, pH 8,2) w 57°C, przez całą noc. DNA był wytrącany roztworem 1,5 M NaCl i etanolem. Po przemyciu 70% etanolem, próbka była rozpuszczana w wodzie i stężenie DNA zostało określone poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm. 3 mikrogramy DNA zostały poddane elektroforezie w 1% żelu agarozowym, z użyciem buforu elektroforetycznego TBE (0,09 M Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8,3). Elektroforeza została przeprowadzona z zastosowaniem napięcia 5 V/cm. Żel był barwiony bromkiem etydydu w stężeniu 1 mg/ml i oglądany w świetle UV (ryc. 1.).

Analiza mutacji genu BRCA1

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

Analiza mutacyjna została przeprowadzona z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu zgodnie z zaleceniami producenta (Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska) (ryc. 2.).

Analiza statystyczna

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

Wyniki

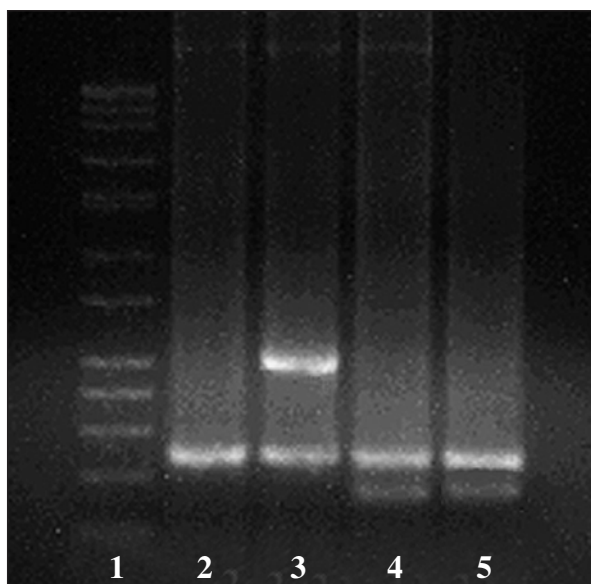
Analiza mutacji genu BRCA1 została przeprowadzona u 30 osób z rodzin obciążonych dziedzicznie tym nowotworem. Wykryto 3 mutacje genu BRCA1; jedną mutację Ex20insC i dwie ExIII7delA. Częstość mutacji wynosiła 10% (3/30). Wszystkie mutacje dotyczyły przypadków o wysokiej częstości zmian apoptotycznych. Częstość apoptozy u osób obciążonych dziedzicznie



i w kontroli została przedstawiona w tab. I. 11 z 30 osób z rodzin obciążonych dziedzicznie (37%) charakteryzowało się obecnością apoptotycznych uszkodzeń DNA w limfocytach krwi obwodowej, natomiast tylko 4 z 30 przypadków kontrolnych (13%) wykazywało fragmentację DNA. Obecność *drabinek apoptotycznych* w limfocytach krwi obwodowej u osób z rodzin obciążonych była statystycznie istotnie wyższa niż w kontroli ($P < 0,05$).

Dyskusja

Wiele czynników odgrywa istotną rolę w zapoczątkowaniu rozwoju nowotworu gruczołu piersiowego, a wśród nich ważne miejsce zajmują czynniki genetyczne. Istotnymi regulatorami prawidłowych biologicznych procesów w komórce, np. różnicowania i proliferacji są protoonkogeny komórkowe. Wiele zmian molekularnych, głównie mutacji, może zaburzać funkcje protoonkogenów, prowadząc do ich przekształcenia w onkogeny. Produkty białkowe onkogenów są czynnikami aktywującymi rozwój nowotworu. W nowotworach piersi zaobserwowano zjawisko powstawania wie-

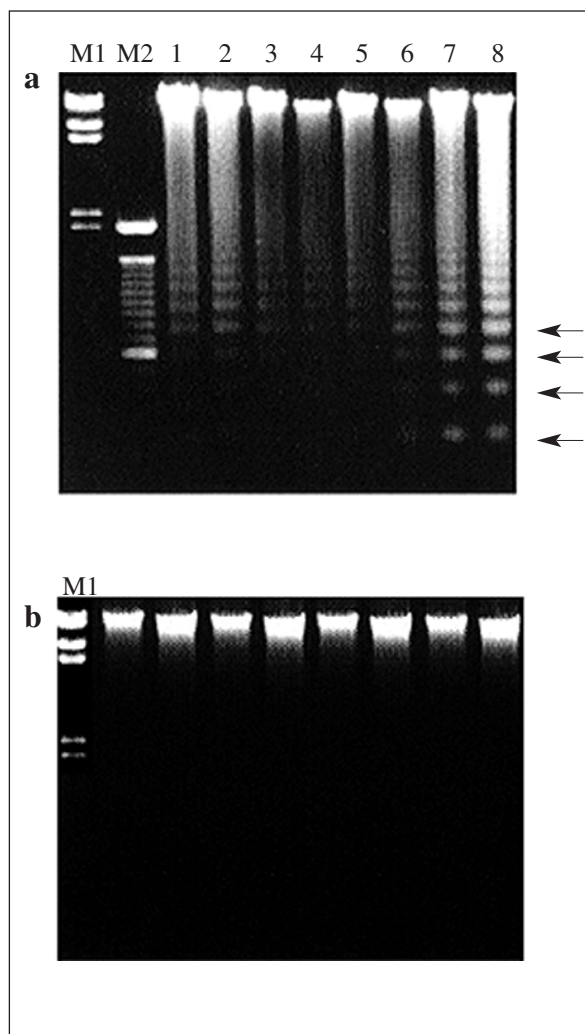


Ryc. 2. Typowy wynik reakcji PCR przeprowadzonej z fragmentami genu BRCA1 i analizowanego poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym po barwieniu bromkiem etydyny i analizowaniu w świetle UV. Ścieżka 1. – marker mas cząsteczkowych, 50–2 000 pz (Sigma, St. Louis, USA), ścieżka 2. – produkt amplifikacji bez mutacji, ścieżka 3. – produkt amplifikacji ze starterami charakterystycznymi dla mutacji ExIII7delA i po trawieniu enzymem restrykcyjnym *AvaII*, ścieżka 4. – produkt amplifikacji ze starterami charakterystycznymi dla mutacji Ex20insC po trawieniu enzymem restrykcyjnym *AvaII*, ścieżka 5. – kontrola PCR po trawieniu enzymem restrykcyjnym *AvaII*

Tab. I. Częstość apoptozy w grupie pacjentek obciążonych dziedzicznie rakiem piersi i w grupie kontrolnej

Grupa badana (n = 30)		Grupa kontrolna (n = 30)	
apoptoza		apoptoza	
obecność	brak	obecność	brak
11 (0,37) ^a	19 (0,63)	4 (0,13)	26 (0,87)

^a $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą



Ryc. 1. Elektroforeza w żelu agarozowym DNA uzyskane-go z limfocytów krwi obwodowej pobranych od chorych na raka piersi (ryc. a.) i od grupy kontrolnej (ryc. b.). Charakterystyczne dla procesu apoptozy drabinki apoptotyczne (ryc. a.) zostały oznaczone strzałkami. M1 – marker długości par zasad *lambda-HindIII* (Qiagen, Hilden, Germany), M2 – marker długości par zasad – 100 bp ladder (Qiagen, Hilden, Germany), M – marker długości par zasad – 50–2 000 bp ladder (Sigma, St. Louis, USA)



lu kopii (amplifikacji) niektórych onkogenów, lub nadmiernej ekspresji kodowanych przez nie białek. Zjawisko to wiąże się ze zwiększeniem złośliwości guza nowotworowego i tym samym ze złym rokowaniem. Do najczęściej opisywanych onkogenów, ulegających powtarzalnym zaburzeniom w raku piersi należą *erbB-2* (*HER2/neu*), *c-myc* oraz *int2* [9, 10]. Onkogen *erbB-2* jest zlokalizowany w 17q21 i koduje glikoproteinę o masie 185 kDa, która jest zaliczana do rodziny receptorów czynników wzrostowych, do których należą m.in. receptor nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGFR), oraz białka kodowane przez *erbB-3* i *erbB-4*. Badania wskazują, że onkogen *erbB-2* jest markerem agresywności nowotworu gruczołu piersiowego [11].

Geny supresorowe są to geny, które w przypadku utraty swoich funkcji poprzez mutacje somatyczne, głównie delecje, prowadzą w niektórych przypadkach do wzrostu aktywności onkogenów i rozwoju guza nowotworowego. Najsilniej związane z powstawaniem raka piersi są geny supresorowe *BRCA1* i *BRCA2* [12]. Sugeruje się też, że mutacje w genie supresorowym *p53* są koniecznym krokiem w rozwoju wielu nowotworów, w tym raka piersi [13, 14]. Gen supresorowy *p53* koduje białko jądrowe, które hamuje progresję cyklu komórkowego, stymuluje naprawę uszkodzonego DNA, jest czynnikiem transkrypcyjnym oraz pełni ważną rolę w indukowaniu apoptozy. Apoptoza indukowana przez *p53* pełni istotną

rolę w rozwoju nowotworów *in vivo*, a liczne sygnały mitogenne antagonizują działanie *p53* [15, 16].

W celu określenia faktu, czy członkowie rodzin obciążonych dziedzicznie rakiem piersi podlegają zjawisku apoptozy i mutacjom w genie *BRCA1* genomowy DNA był izolowany z krwi uzyskanej od osób obciążonych rakiem piersi, zgłaszających się do Onkologicznej Poradni Genetycznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

Zmiany apoptotyczne zostały znalezione w 37% przypadków rodzin obciążonych rakiem piersi. Stwierdzono, że mutacja w genie *BRCA1* występuje u osób z tych rodzin, u których stwierdza się wysoki stopień apoptozy. Sugeruje to, że apoptoza może być związana z wysokim ryzykiem raka piersi u członków tych rodzin, którzy poddali się badaniu genetycznemu.

Wysoka częstość apoptozy oraz mutacji w genie *BRCA1* u kobiet obciążonych dziedzicznie rakiem piersi dostarcza motywu do zastosowania tych czynników jako markera wykrywania grupy wysokiego ryzyka wystąpienia tego nowotworu. Kolejne badania, które obejmą większą grupę badaną, są konieczne do potwierdzenia tego przypuszczenia.

Praca powstała w ramach grantów uzyskanych z Komitetu Badań Naukowych nr 3P05C 066 24 i 3 P05E 07124.

Summary

Purpose: Susceptibility to breast cancer appears to be linked to germ-line mutations in genes causing various familial cancer syndromes. Moreover apoptotic cell death plays a central role in the pathogenesis and disease progression of this cancer. The objectives of this study were to determine apoptosis and the frequency of *BRCA1* germ-line mutations in patients with family history of breast cancer.

Materials and methods: The study population consisted of 30 patients from breast cancer family and 30 control samples. Patients completed a family history questionnaire and provided blood for mutation analysis.

Results: Out of the 30 investigated samples, 11 (or 37%) were found to be apoptosis positive compared as 13% control. One *Ex20insC* and two *ExIII7delA* mutations of *BRCA1* gene were identified in apoptosis positive samples from breast cancer families.

Conclusion: Genetic alterations seem to be a risk factor of breast cancer in subjects belonged to breast cancer families with high incidence of this cancer. The lack of detectable germ-line mutations in most cases suggests that there are probably additional, as yet unidentified genes predisposing to this disease.

Key words: breast cancer, *BRCA1* gene, apoptosis, PCR

Piśmiennictwo

1. Arai M, Utsunomiya J, Miki Y. *Familial breast and ovarian cancers*. Int J Clin Oncol 2004; 9: 270-82.
2. Narod SA, Foulkes WD. *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer 2004; 4: 665-76.
3. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.



4. Wyllie AH. *Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview*. Cancer and Metastasis Reviews 1992; 11: 95-103.
5. Lipponen P. *Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters*. Endocr Relat Cancer 1999; 6: 13-6.
6. Mendez O, Manas S, Fabra A, et al. *Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat 2001; 65: 171-7.
7. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, et al. *Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer*. J Clin Oncol 2000; 18: 3775-81.
8. Codegoni AM, Bertoni F, Colelle G, et al. *Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer*. Oncol Res 1999; 11: 297-301.
9. Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, et al. *Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers*. J Clin Oncol 1998; 16: 462-9.
10. Stark A, Hulka B, Scott J, Novotny D. *HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer*. J Clin Oncol 2000; 18: 267-74.
11. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. *ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance*. Eur J Cancer, 1998; 34: 791-808.
12. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, et al. *Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited*. Cancer Res 1998; 58: 1588-92.
13. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers*. Science 1991; 253: 49-53.
14. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgarsdsdottir R, et al. *BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability*. Cancer Res 1998; 58: 859-62.
15. Symonds H, Krall L, Remington L, et al. *p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo*. Cell 1994; 78: 703-11.
16. Hong M, Lai MD, Lin YS, Lai MZ. *Antagonism of p53-dependent apoptosis by mitogen signals*. Cancer Res 1999; 59: 2847-52.

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 20 71
 e-mail: smolbea@wp.pl

