

Niestabilność mikrosatelitarna w raku piersi

Microsatellite instability in breast carcinoma

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

Wprowadzenie. Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) jest wynikiem defektów mechanizmów odpowiedzialnych za poreplikacyjną naprawę DNA. Zaburzenia funkcjonowania genów systemu naprawczego MMR powodują błędy w replikacji przejawiające się niestabilnością markerów mikrosatelitarnych. Badania wskazują, że zarówno dziedziczny, jak i sporadyczny rak piersi może być związany z mutacjami w genach systemu naprawczego, takich jak MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 i MSH6.

Cel pracy. W pracy przedstawiono przegląd badań dotyczących analizy niestabilności mikrosatelitarnej u chorych na dziedzicznego i sporadycznego raka piersi.

Wnioski. Badania sugerują, że niestabilność mikrosatelitarna może być czynnikiem ryzyka rozwoju raka piersi u osób z rodzin HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) z wysoką częstością tego nowotworu jak i sporadycznego raka piersi.

Słowa kluczowe: rak piersi, geny MMR, niestabilność mikrosatelitarna, PCR

(Przegląd Menopauzalny 2004; 6: 40–46)

Wstęp

Rak piersi

Rak piersi jest jednym z najczęstszych i najgroźniejszych nowotworów złośliwych u kobiet. W Polsce rak piersi, stanowiąc ok. 12% wszystkich zachorowań na nowotwory, ciągle lokuje się na pierwszym miejscu wśród zachorowań na nowotwory w populacji żeńskiej i utrzymuje się również na pierwszym miejscu jako przyczyna zgonów [1, 2]. Częstość zachorowań na nowotwory złośliwe piersi gwałtownie wzrasta po 35. roku życia, a w ogólnej liczbie zachorowań na raka piersi prawie 30% dotyczyło kobiet w wieku przedmenopauzalnym, natomiast pozostałe 70% kobiet w wieku

pomenopauzalnym. Rak sutka u kobiet przed 30. rokiem życia występuje rzadko [1].

Należy pamiętać, że nie każdy guz wykryty w piersi jest rakiem, tj. nowotworem złośliwym. Na jeden nowotwór złośliwy przypada 10 innych łagodnych i niegroźnych. Na 10 kobiet, u których stwierdzono raka piersi, przy obecnym stanie wiedzy i technik leczniczych, na świecie 6–7 może być leczonych bez mastektomii, czyli bez usunięcia gruczołu sutkowego, a dla 3 lub 4 przyczyną śmierci będzie inna choroba niż rak.

Każda kobieta, która odkryje zgrubienie w piersi powinna bez najmniejszego zwlekania zgłosić się do lekarza i rozpocząć niezbędne działania diagnostyczne. W większości przypadków zauważona zmiana w piersi

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

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

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



nie okaże się rakiem, jednak jeśli będzie to nowotwór złośliwy, to szybkie rozpoczęcie diagnozowania i leczenia znacznie zwiększa prawdopodobieństwo wyleczenia [3].

Szybkość postępu raka i tworzenie przerzutów stanowi wypadkową pomiędzy jego złośliwością a odpowiedzią immunologiczną organizmu. Guz pierwotny u ponad 50% chorych umiejscowiony jest w górno-zewnętrznym kwadrancie sutka. Pierwszym etapem rozprzestrzeniania się nowotworu są przerzuty do węzłów chłonnych. Guzy z bocznych kwadrantów sutka dają przerzuty częściej do węzłów pachowych, a guzy położone przyśrodkowo tworzą także przerzuty w węzłach zamostkowych. Natomiast przerzuty do węzłów nadobojczykowych powstają późno, zazwyczaj po zajęciu węzłów pachowych. Przerzuty odległe, do których dochodzi drogą krwi powstają najczęściej w kościach, płucach, wątrobie i mózgu [1, 2].

Wiedza o przyczynach raka piersi może znacznie zwiększyć szansę uniknięcia tej choroby przez podejmowanie odpowiednich decyzji. Nie wszyscy ludzie w jednakowy sposób są zagrożeni zachorowaniem na raka, w tym także na raka piersi. Na większą lub mniejszą podatność na tę chorobę ma wpływ wiele czynników. Główne czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi przedstawiono w tab. I.

Najczęściej mamy do czynienia z rakami nienaciekającymi, przedinwazyjnymi (*in situ*), które stanowią ok. 15% wszystkich raków piersi oraz z rakami naciekającymi, które stanowią ok. 85% wszystkich raków piersi. Nowotwory te naciekają podścieliska oraz dają przerzuty naczyniami chłonnymi i krwionośnymi. Niekiedy młode kobiety wykrywają w swoich piersiach guzki, które je niepokoją, jednak wykrycie guzka nie zawsze musi oznaczać zmianę o charakterze nowotworu złośliwego.

Dziedziczny rak piersi

Fakt występowania rodzinnej, dziedzicznej autosomalnie dominująco predyspozycji do raka piersi skłoniło 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.

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 sutka [1, 2].

Geny BRCA1 i BRCA2 są genami supresorowymi. Produkt białkowy BRCA1, indukowany przez estroge-

ny, pojawia się w późnej fazie G1 i osiąga szczyt ekspresji w fazie S, a jego regulatorem są kinazy zależne od cyklin, pomimo tego hamuje on proliferację komórek. Ekspresja białka BRCA1 jest szczególnie silna w okresie pokwitania i ciąży [4, 5]. Biologiczna rola BRCA2 chociaż mniej poznana jest podobna do roli BRCA1.

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.

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.

Zwiększona zachorowalność na nowotwory złośliwe występuje, m.in. nie tylko u homozygotycznych, lecz także u heterozygotycznych nosicieli defektów różnych genów, kontrolujących naprawę uszkodzonego DNA i chromosomów. Wiedza o naturze i lokalizacji tych genów jest nadal – z nielicznymi wyjątkami – bardzo ograniczona; z analiz skuteczności naprawy DNA i chromosomów po napromienianiu lub poddaniu komórek działaniu czynników mutagennych wynika jednak, że częstość heterozygotycznego nosicielstwa takich defektów, warunkujących kilkukrotny wzrost ryzyka zachorowania może sięgać od 10–20%.

Czynniki prognostyczne

Zasadniczym kryterium prognostycznym w raku piersi jest zaawansowanie wg klasyfikacji TNM. Najsilniejszym czynnikiem rokowniczym jest stan regionalnych węzłów chłonnych [6]. Wielkość guza jest ściśle związana z prawdopodobieństwem wystąpienia wznowny guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i zgonu. Cechą korzystną rokowniczo jest obecność receptorów estrogenowych i progesteronowych. Do innych czynników należy typ histologiczny, stopień złośliwości histologicznej wg skali Richardsona-Blooma. Żaden czynnik, zarówno rozpatrywany pojedynczo, jak i w powiązaniu z innymi nie jest w stanie dokładnie określić przebiegu choroby. W badaniach klinicznych ocenia się także inne czynniki, o różnej wartości rokowniczej: EGFR, c-erbB-2, c-myc, ps2, p53, MDR-1, BRCA-1, BRCA-2, markery aktywności proliferacyjnej guza: indeks mitotyczny (MI), indeks znakowanej tymidyny (TLI), frakcja komórek w fazie S (SPF), PCNA, Ki-67, ploidia DNA, markery angiogenezy, markery wysokiego ryzyka przerzutowania: katepsyna-D, nm-23, aktywator plazminogenu (UPA) [7].

Kancerogeneza raka piersi jest procesem nie w pełni wyjaśnionym, ze względu na różnorodność wymienionych już wcześniej czynników, mogących jej sprzy-



Tab. I. Czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi

Wielkość ryzyka:	Rodzaj ryzyka:
1–2 razy większe	– miasto jako miejsce zamieszkania, – wczesny wiek pierwszej miesiączki, – późny wiek menopauzy
2–3 razy większe	– wysoki stan socjoekonomiczny, – wiek pierwszego porodu po 30. roku życia, – otyłość 30 i więcej % powyżej normy, – łagodne zmiany w sutku, – niezachodzenie w ciążę
3–4 razy większe	– 2 raki sutka u najbliższych krewnych, – napromieniowanie na okolicę sutka z innych powodów niż nowotwór sutka
ponad 5 razy większe	– 3 raki sutka u najbliższych krewnych, – rak drugiego sutka lub 2 raki sutka u krewnych pierwszego stopnia, które zachorowały przed 50. rokiem życia
ponad 20 razy większe	– wiek powyżej 50. roku życia w porównaniu do wieku 35–39 lat
ponad 20 razy większe	– obecność charakterystycznych mutacji BRCA-1, – rak drugiego sutka
położenie geograficzne	rak piersi najczęściej występuje w krajach zachodnich, zaś dużo rzadziej w Azji i Afryce. Na raka piersi chorują zwykle białe kobiety, żyjące w dosyć chłodnym klimacie w krajach wysoko rozwiniętych, co jest uzależnione od wpływu takich czynników, jak rasa, klimat, sposób odżywiania, rodzaje przebytych chorób, kultura i styl życia, sposób planowania rodziny, wiek zajścia w pierwszą ciążę, liczba dzieci, popularność karmienia piersią itp. Kobiety rasy czarnej czy żółtej chorują rzadziej
wiek	ryzyko zachorowania na raka piersi wzrasta wraz z wiekiem, po 35. roku życia, a najwięcej zachorowań występuje pomiędzy 50.–70. rokiem życia. Wraz z długością życia kobieta bardziej jest narażona na wpływ różnych czynników ryzyka lub na jednoczesne wyzwolenie się kilku czynników ryzyka choroby (rasa, klimat, dieta, styl życia, metody planowania rodziny, elementy kulturowe itp.), które mogą wzmacniać istniejące predyspozycje genetyczne
czynniki genetyczne	rak piersi uwarunkowany genetycznie stanowi do 10% wszystkich jego postaci i najczęściej jest wynikiem mutacji genów: BRCA1, BRCA2, p53, ATM. Im więcej chorych jest w rodzinie i im bliższy stopień pokrewieństwa z nimi, tym większe ryzyko zachorowania na raka. Ryzyko wzrasta, gdy nowotwory te występują zarówno u matki i siostry, przed 35. rokiem życia. U kobiet, których matki zachorowały na obustronny rak sutka ryzyko wystąpienia nowotworu wynosi 50 proc. Rak piersi często występuje w przebiegu kilku uwarunkowanych dziedzicznie zespołów: – dziedziczny rak piersi – <i>site specific</i> , – zespół rak piersi-rak jajnika, – zespół Li-Fraumeni, – zespół Lynch II, – choroba Cowdena, – zespół Peutz-Jaeghersa, – ataksja-teleangiektazja, – zespół Klinefeltera
promieniowanie jonizujące	duże dawki promieniowania mogą być przyczyną rozwoju raka sutka, np. u kobiet mieszkających w Hiroszimie lub Nagasaki, które w czasie wybuchu bomb otrzymały wysoką dawkę promieniowania nowotwór sutka rozwija się znacznie częściej. Również u kobiet, które otrzymywały w przeszłości duże dawki promieni rentgenowskich podczas wykonywania zdjęć radiologicznych rak sutka rozwija się znacznie częściej, dlatego zaleca się ochronę przed zbędnymi dawkami promieniowania radioaktywnego
aborcja i poronienia	ryzyko zachorowania na raka piersi jest znacznie wyższe u kobiet, które poddały się chociaż jeden raz zabiegowi przerwania ciąży
karmienie piersią	karmienie piersią chroni przed rozwojem raka piersi kobiety, u których ryzyko zachorowania na raka jest znacznie mniejsze. Nawet stosunkowo krótki okres karmienia piersią daje pewną ochronę. Specjaliści zalecają młodym mamom karmienie piersią, choćby przez kilka tygodni dla zmniejszenia ryzyka zachorowania w przyszłości na raka piersi
alkohol	nadmierne spożycie alkoholu przez dłuższy czas zwiększa ryzyko rozwoju raka piersi w wyniku zaburzenia metabolizmu estrogenów w wątrobie, gdzie zarówno estrogeny, jak i alkohol ulegają metabolizmowi. Przy nadmiernym spożyciu alkoholu wątroba traci zdolności do metabolizowania estrogenów, prowadząc do podwyższenia poziomu tego hormonu we krwi, co zwiększa ryzyko zachorowania na raka sutka. Alkohol spożywany z umiarem nie stanowi większego ryzyka



Tab. I. cd.

pleć	rak sutka u kobiet występuje 100-krotnie częściej niż u mężczyzn
dieta	podejrzewa się, że jednym z czynników zwiększającym ryzyko rak piersi może być duża zawartość tłuszczu w pożywieniu. Inne koncepcje kierują się raczej na związek zachorowania na raka piersi z otyłością, a nie udziałem tłuszczu w diecie
otyłość	otyłość zwiększa ryzyko rozwoju raka piersi. U osób takich trudniejsze jest wykrywanie zmian w piersiach, a komórki tłuszczowe, wytwarzając dodatkowe estrogeny zwiększają ekspozycję na te hormony. Większe ryzyko występuje u kobiet w okresie menopauzalnym, gdy zmienia się w ich organizmie rozkład tkanki tłuszczowej
czynniki hormonalne endogenne	większe ryzyko rozwoju raka sutka występuje: <ul style="list-style-type: none"> – u kobiet, u których pierwsza miesiączka wystąpiła przed 12. rokiem życia, – u kobiet, u których klimakterium wystąpiło powyżej 55. roku życia, – u kobiet, które nie rodziły, – u kobiet, które urodziły po raz pierwszy po 30. roku życia
czynniki hormonalne egzogenne	hormonalne środki antykoncepcyjne – uważa się, że doustne tabletki antykoncepcyjne (zawierające głównie estrogeny), jeśli w ogóle mają jakiś związek z rakiem piersi, to być może działają jako czynnik ułatwiający i przyspieszający rozwój choroby, która już wystąpiła, niż jako czynnik powodujący mutacje genetyczne i wywołujący chorobę. Uważa się, że tabletki składające się tylko z progesteronu, i tzw. <i>minipigułki</i> nie zwiększają ryzyka wystąpienia raka piersi. Tabletki mogą nieznacznie zwiększać ryzyko choroby u kobiet genetycznie obciążonych lub u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne przez co najmniej 8 lat do zajścia w pierwszą ciążę. Uważa się, że preparaty zawierające jedynie progesteron nie wpływają na ryzyko wystąpienia raka piersi, natomiast preparaty zawierające zarówno progesteron, jak i estrogeny mogą mieć wpływ na powstanie tego nowotworu. Ryzyko wzrasta u kobiet przyjmujących środki hormonalne dłużej niż 8 lat; hormonoterapia zastępcza – stosowanie HTZ w okresie przekwitania zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi o ok. 6%, a przy okresie stosowania ponad 10 lat ryzyko wzrasta do 30%. Ryzyko zachorowania na raka piersi dotyczy głównie kobiet z grupy wysokiego ryzyka, np. obciążonych genetycznie. Hormonalna terapia zastępcza chroni natomiast przed nowotworem płuc, jelita grubego, jajników oraz szyjki macicy (preparaty zawierające wyłącznie estrogeny zwiększają ryzyko zachorowania na raka trzonu macicy) oraz chorobą niedokrwienną serca
choroby piersi z proliferacją	ryzyko wzrasta w przypadku stwierdzenia zmian rozrostowych, takich jak hiperplazja atypowa lub LCIS. Rozrost wewnątrzprzewodowy z atypią jest uważany za stan przedrakowy. Należy pamiętać jednak o tym, że u 75% kobiet nie występują żadne znane czynniki ryzyka
rak macicy i jajników	u kobiet z tymi nowotworami ryzyko zachorowania na raka sutka jest 2 razy większe niż w całej populacji kobiet
rak drugiego sutka	u kobiet po leczeniu raka piersi ryzyko powstania raka w drugim sutku wzrasta co roku o 1%

jać. Powstanie nowotworu jest procesem wieloetapowym. Czynniki rakotwórcze oddziałujące na nasz organizm przeważnie nie wywołują bezpośrednio rozwoju nowotworu, ale indukują powstanie endogennych czynników pośrednich, którymi są często wolne rodniki tlenowe lub utlenowane przez nie związki. Dopiero one mogą uszkadzać DNA i wywoływać mutacje punktowe lub chromosomowe. Niektóre spośród tych mutacji prowadzą do transformacji nowotworowej dotkniętej nimi komórki i w efekcie do powstania nowotworu. Na każdym z tych etapów działają naturalne czynniki antykanцерогенne endogenne lub egzogenne (np. witaminy A, C, E, glutation, enzymy wymiatające wolne rodniki i naprawcze struktury DNA).

Niestabilność mikrosatelitarna

Sekwencje mikrosatelitarne są to krótkie, powtarzające się sekwencje nukleotydów, rozsiane w warunkach prawidłowych w całym genomie. W genomie Eukaryota

występują powtórzenia jedno-, dwu-, trzy- i czteronukleotydowe. Ponad 90% przebadanych dotychczas sekwencji mikrosatelitarnych od mononukleotydów do tetranukleotydów wykazuje polimorfizm. W genomie człowieka najczęściej występuje 5 grup powtórzeń, przy czym A>AC>AAAB> AAB>AG (B oznacza cytozynę, guaninę lub tymidynę). Te 5 grup stanowi 76% wszystkich sekwencji mikrosatelitarnych. Około 12% tych sekwencji stanowią tandemy długości równej lub większej niż 40 nukleotydów. Najczęściej w genomie człowieka występuje powtórzenie dwunukleotydu (CA)_n/(GT)_n, potocznie określane powtórzeniem CA. W genomie człowieka występuje ok. 50–100 tys. sekwencji powtórzonych CA i pojawiają się one średnio co 30 kpz w euchromatinie. Powtórzenia CA mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki przeszukaniu bibliotek krótkich sekwencji sondami poli(dC:dA)/poli(dG:dT).

W genomie komórek rakowych, w tym raka piersi, wykryto zaburzenia w sekwencjach mikrosatelitarnych [8]. Za zmiany te, określane mianem niestabilności se-



Tab. II. Geny MMR

	Gen	Locus
1.	<i>MSH2</i>	2p22-p21
2.	<i>MSH3</i>	5q11-q12
3.	<i>MSH6</i>	2p16
4.	<i>MSH4</i>	1p31
5.	<i>MSH5</i>	6p21.3
6.	<i>PMS1</i>	2q31.1
7.	<i>MLH1</i>	3p21.3
8.	<i>PMS2</i>	7p22
9.	<i>MLH3</i>	14q24.3
10.	<i>PMS2L3</i>	7q11-q22
11.	<i>PMS2L4 (PMS6)</i>	7q11-q22

kwencji mikrosatelitarnych (MSI – *microsatellite instability*) jest odpowiedzialny uogólniony defekt mechanizmów, odpowiadających za wierność replikacji DNA lub za poreplikacyjną naprawę DNA [8]. Defekty tego typu pojawiają się w wyniku mutacji genów mutatorowych MMR (*Mismatch Repair*), biorących udział w naprawie nieprawidłowo sparowanych zasad DNA oraz zasad niesparowanych, powstających wskutek insercji lub delecji (tab. II) [9]. 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: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* i *hPMS2* [10, 11]. Najczęściej występują one w genie *hMLH1* [12–15].

Gen *hMLH1* (ang. *Human mutL E. Coli MLH1 S. Cerevisiae homologue*) został zlokalizowany na chromosomie 3p21. Jest on homologiczny do genu *mutL* bakterii, który koduje białko o długości 756 aminokwasów, wykazujące 41% homologii z produktem genu *yMLH1* drożdży (13 aminokwasów C-końcowych jest identycznych). Gen *hMLH1* składa się z 19 eksonów i obejmuje bez regionu promotora ok. 58 kbp (długość cDNA 2484 pz). W naprawie poreplikacyjnej błędnie sparowanych zasad białko MLH1 oddziałuje wspólnie z produktem genu *hMSH2*.

W wyniku mutacji germinalnych dochodzi do uszkodzenia jednego allelu odpowiedniego genu mutatorowego. Jeden prawidłowy allel może spełniać funkcje naprawcze. Osoby, u których doszło do mutacji jednego allelu odpowiedniego genu mutatorowego są heterozygotami i nie chorują na raka. Dopiero kiedy druga mutacja somatyczna doprowadzi do inaktywacji jedyne go prawi-

łowo funkcjonującego allelu, komórka która wcześniej skumulowała mutacje innych onkogenów i antyonkogenów staje się komórką nowotworową. Raki z mutacjami genów mutatorowych mają podobne cechy biologiczne. Stwierdza się w nich nieliczne aberracje chromosomowe i posiadają zwykle diploidalną ilość DNA. Rzadko towarzyszą im mutacje genów *p53* czy *K-ras*.

Obecność mutacji w rozsianych po całym genomie w liczbie ok. 100 000 kopii sekwencjach typu mikrosatelit sugeruje uogólniony defekt w mechanizmach odpowiadających za wierność replikacji DNA lub poreplikacyjną naprawę DNA. Dlatego też guzy z takimi zmianami określono mianem RER+ (*Replication Errors*). Mutacje somatyczne w genie *hMSH2* okazały się odpowiedzialne za fenotyp RER+ w raku jelita grubego oraz w raku endometrium i piersi w koincydencji z rakiem jelita grubego [16–19]. W raku piersi wykryto poza tym zaburzenia w genach *hMLH1* i *hMSH3* [19]. W guzach RER+ obserwuje się ekspansję sekwencji mikrosatelitarnej zlokalizowanej w sekwencji kodującej genu receptora typu II transformującego czynnika wzrostowego (TGFβRII). Mutacja ta powoduje inaktywację receptora. Ponieważ TGFβ jest inhibitorem proliferacji komórek nabłonkowych utrata receptora TGFβRII czyni komórki nowotworowe niewrażliwymi na hamujące działanie TGFβ. A zatem mutacje w genie receptora TGFβ, a więc w genie o znanej funkcji w regulacji proliferacji, wiążą się z niestabilnością sekwencji mikrosatelitarnych [20, 21].

Defekty w systemie naprawczym MMR i powstanie niestabilności mikrosatelitarnej MSI są wynikiem wzrostu tolerancji komórkowej na czynniki metylujące, jak N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU) czy N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanina (MNNG). Zarówno MNU i MNNG powodują metylację w pozycji O⁶ guaniny w cząsteczce DNA. Enzym O⁶-metyloguanina-DNA metylotransferaza (MGMT), która przenosi grupy metylowe na cysteinę odwraca uszkodzenia DNA. Jednakże MGMT jest skutecznie hamowana przez powstającą hipermetylację, a jej ekspresja w tkance nowotworowej staje się niższa w porównaniu do innych tkanek. Niski poziom MGMT powoduje akumulację O⁶-metyloguaniny w tkance rakowej. O⁶-mG promuje formowanie się hybryd O⁶-mG/T, które są rozpoznawane przez system MMR. Jednakże mechanizm ten zwraca się tylko w kierunku nowo powstałych nici, natomiast nie naprawia uszkodzeń na niciach starych. W związku z tym następuje akumulacja błędów, prowadzących do powstania mutacji, a następnie utrata lub zahamowanie funkcji genów uczestniczących w systemie MMR. Podsumowując, mutageny metylujące, będące przyczyną uszkodzeń DNA wywołują zahamowanie syntezy i naprawę DNA, a następnie w dalszym toku działania niszczą ten kontrolny mechanizm.



Niestabilność mikrosatelitarna a rak piersi

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) po raz pierwszy została wykryta u rodzin z zespołem HNPCC (ang. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) [22]. HNPCC jest często dzielony na 2 grupy: zespół Lyncha I i zespół Lyncha II. Za ich powstawanie odpowiedzialny jest defekt w genach naprawczych. W 90% przypadków HNPCC mutacje germinalne mają miejsce w genach *hMSH2* i *hMLH1* [23, 24]. Badania histologiczne guzów z wykrytą mutacją w genie *hMSH2* lub *hMLH1* wykazały, że w grupie pacjentów z mutacją w *hMSH2* stwierdza się częstsze występowanie nowotworów poza jelitem grubym niż w grupie z *hMLH1* i w ogóle pacjentów z rakami jelita grubego. Kolejne badania wykazały, że MSI jest obecna w ok. 20% sporadycznych raków jelita grubego [25, 26].

Jednym z nowotworów, występujących w koincydencji z rakiem jelita grubego jest rak piersi [27]. W genomie jego komórek dochodzi często do MSI pod wpływem uszkodzeń w genach mutatorowych. Poza tym wiadomo, że niestabilność mikrosatelitarną spotyka się w sporadycznych przypadkach raka piersi [28, 29]. Dotychczasowe badania wskazują, że niestabilność mikrosatelitarna jest istotna dla rozwoju tego nowotworu [30, 31]. Wiadomo, że głównie mutacje w genie naprawczym *hMLH1* prowadzą do rozwoju MSI w 43% sporadycznego raka piersi. Mutacje tego genu

dotyczą przede wszystkim domen konserwatywnych i mają charakter delekcji, insercji oraz tranzycji i transwersji. Mutacje te są rozrzucone wzdłuż całego regionu kodującego genu. W regionie 3' w eksonach od 15 do 19 występuje 38% wszystkich poznanych mutacji genu *hMLH1*. Najczęściej obserwowaną mutacją jest delekcja w eksonie 16. Innym gorącym miejscem w genie *hMLH1* są podobnie jak w *hMSH2* dinukleotydy CpG. W przypadku raka piersi w koincydencji z rakiem jelita grubego najczęściej stwierdza się mutacje Ser44Phe w eksonie 2 genu *hMLH1*, Ala441Thr w eksonie 12 i delekcję T w pozycji 590 w eksonie 16 [32].

Stone i wsp. wykazali, że w raku piersi typu lobularnego najczęstsze są dwie mutacje w genie *hMLH1*. Jedną z mutacji to substytucja CTT→CAT w kodonie 607 (ekson 16) zamiana leucyny do histydy, druga to podstawienie TAC→TAA w kodonie 750 (ekson 19) [33].

Wiadomo, że wiele czynników odgrywa istotną rolę w zapoczątkowaniu rozwoju nowotworu gruczołu piersiowego, a wśród nich ważne miejsce zajmują czynniki genetyczne. Liczne dane literaturowe wskazują na fakt znaczącej roli niestabilności mikrosatelitarnej w procesie nowotworzenia. Niewątpliwie w najbliższych latach należy oczekiwać wielu publikacji dotyczących tego tematu.

Pracę wykonano w ramach grantu nr G7 z budżetu Gminy Łódź.

Summary

Background: *Microsatellite instability (MSI) is due to defective DNA mismatch repair. Defects in DNA mismatch-repair (MMR) genes lead to replication errors revealed as instability in microsatellite markers. Studies have shown that both hereditary breast cancer and sporadic breast cancer may be associated with mutations in a mismatch repair genes, such as MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 and MSH6.*

Approach: *Results from studies that assayed microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancer are reviewed.*

Conclusion: *Several data suggest that microsatellite instability seem to be a risk factor both breast cancer in subjects belonged to HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) families with high incidence of this cancer and sporadic breast cancer.*

Key words: *breast cancer, MMR genes, microsatellite instability, PCR*

Piśmiennictwo

1. Jassem J. *Rak sutka*. Springer PWN, Warszawa 1998.
2. Spaczyński M. *Onkologia ginekologiczna*. Urban & Partner, Wrocław 1997.
3. Hortobagyi GN. *Treatment of breast cancer*. N Engl J Med 1998; 339: 974-84.
4. Marcus JN, Page DL, Watson P. *BRCA1 and BRCA2 hereditary breast carcinoma phenotypes*. Cancer 1997; 80: 543-56.
5. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C. *Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited*. Cancer Res 1998; 58: 1588-92.
6. McGuire W, Clark GM. *Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer*. N Engl J Med 1992; 326: 1756-61.
7. Ravaoli A, Bagli L, Zucchini A, Monti F. *Prognosis and prediction of response in breast cancer: The current role of the main biological markers*. Cell Proliferation 1998; 31: 113-26.



8. Lothe RA. *Microsatellite instability in human solid tumours*. Mol Med Today 1997; 3: 61-8.
9. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. *Human DNA repair genes*. Science 2001; 291: 1284-9.
10. Eshleman JR, Markowitz SD. *Mismatch repair defects in carcinogenesis*. Hum Mol Genet 1996; 5: 1489-94.
11. Arnheim N, Shibata D. *DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis*. Curr Opin Genet Dev 1997; 7: 364-70.
12. Luqmani YA, Temmim LL, Mathew M. *Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast cancer*. Oncol Rep 2002; 9: 417-21.
13. Orlandi F, Barucca A, Biagini G, et al. *Molecular stability of DNA typing short tandem repeats in the mammary tree of patients with breast cancer*. Diagn Mol Pathol 2002; 11: 41-6.
14. Muller A, Edmonston T, Corao DA, et al. *Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Cancer Res 2002; 62: 1014-9.
15. Watanabe N, Okochi E, Mochizuki M, et al. *The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines*. Cancer Res 2001; 61: 7739-42.
16. Berends M, Hollema H, Wu Y. *MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer*. Int J Cancer 2001; 92: 398-403.
17. Furlan D, Casati B, Cerutti R. *Genetic progression in sporadic endometrial and gastrointestinal cancers with high microsatellite instability*. J Pathol 2002; 197: 603-9.
18. Kowalski LD, Mutch DG, Herzog TI. *Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER+ endometrial cancers*. Genes Chrom Cancer 1997; 18: 219-27.
19. Risinger JI, Barrett JC, Watson P, et al. *Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome*. Cancer 1996; 77: 1836-43.
20. Eshleman JR, Markowitz SD. *Mismatch repair defects in carcinogenesis*. Hum Mol Genet 1996; 5: 1489-94.
21. Speicher MR. *Microsatellite instability in human cancer*. Oncol Res 1995; 7: 267-75.
22. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. Science 1993; 260: 816-9.
23. Moslein G., Tester DJ, Lindor NM. *Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer*. Hum Mol Genet 1996; 5: 1245-1252.
24. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach F. *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. Science 1993; 260: 812-6.
25. 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: 5248-57.
26. Vasen H., Watson P, Mecklin JP. *The ICG-HNPCC. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC*. Gastroenterology 1999; 116: 1453-6.
27. Risinger JI, Barrett JC, Watson P, et al. *Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome*. Cancer 1996; 77: 1836-43.
28. Yee CJ, Roodi N, Varrier CS, Parl FF. *Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer*. Cancer Res 1994; 54: 1641-4.
29. Paulson TJ, Wrought FA, Parker BA, et al. *Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer*. Cancer Res 1996; 56: 4021-6.
30. Benachenhon 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.
31. Borg A, Isola J, Chen J, Rubio C. *Germline BRCA1 and hMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma*. Int J Cancer 2000; 85: 796-800.
32. Hackaman P, Tannergard P, Osei-Mensa S, et al. *A human compound heterozygote for two MLH1 missense mutations*. Nature Genet 1997; 17: 135-6.
33. Stone JG, Coleman G, Gusterson B, et al. *Contribution of germline MLH1 and MSH2 mutations to lobular carcinoma in situ of the breast*. Cancer Lett 2001; 67: 171-4.

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
 faks +48 42 271 14 21

