

Mutacje genu *hMLH1* a sporadyczny rak piersi kobiet

Mutations of hMLH1 gene and sporadic breast cancer

Magdalena Bryś¹, Hanna Romanowicz-Makowska², Aneta Zych¹,
Andrzej Kulig², Wanda Małgorzata Krajewska¹

Cel: Celem przeprowadzonych badań była analiza sporadycznych nowotworów piersi kobiet w aspekcie mutacji w eksonie 8 i 14 genu *hMLH1*.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiło 35 preparatów raków piersi kobiet – bloczki parafinowe oraz 35 preparatów krwi obwodowej pobranej od tych samych pacjentek. Analizę mutacji genu *hMLH1* przeprowadzono przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy i polimorfizmu konformacyjnego pojedynczej nici (PCR-SSCP). W preparatach, w których zidentyfikowano występowanie mutacji, dokonano analizy sekwencyjnej przy wykorzystaniu automatycznego sekwenatora DNA ABI PRISM 377.

Wyniki i wnioski: W wyniku przeprowadzonych badań genu *hMLH1* zaobserwowano występowanie mutacji w 3/35 (8%) przebadanych nowotworów piersi. Dotyczyły one wyłącznie eksonu 8. W toku analizy sekwencyjnej eksonu 8 genu *hMLH1* wykazano, iż dwa z badanych przypadków wykazują substytucję w kodonie 219 (ATC→GTC, Ile→Wal), natomiast w jednym preparacie stwierdzono substytucję w kodonie 226 prowadzącą do powstania kodonu terminacyjnego (CGA→TGA). Niska częstość badanych mutacji nie stwarza przesłanek do typowania eksonu 8 i 14 genu *hMLH1* jako markera procesu nowotworzenia piersi kobiet.

Słowa kluczowe: rak piersi kobiet, gen *hMLH1*, analiza mutacji, PCR-SSCP, automatyczne sekwencjonowanie DNA, ABI PRISM 377

(Przegląd Menopauzalny 2004; 6: 47–50)

Wstęp

Utrzymanie integralności genomowego DNA jest warunkiem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania komórki. Zaburzenia struktury genomu mogą przyczyniać się do rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów złośliwych. Dlatego też ważne jest poznanie mechanizmów zapewniających utrzymanie i wierność przesyłania informacji genetycznej w komórce, spośród których podstawowe znaczenie mają systemy naprawy uszkodzeń DNA. Jednym z tych mechanizmów jest naprawa poreplikacyjna błędnie sparowanych za-

sad azotowych (ang. *mismatch repair*, MMR). Białka naprawy poreplikacyjnej pośredniczą w zatrzymaniu komórek z uszkodzonym DNA w punkcie kontrolnym G₂/M cyklu komórkowego. W przypadku braku naprawy DNA, uruchomiona zostaje apoptoza na drodze zależnej lub niezależnej od białka p53 [1–4].

Zaburzenia funkcjonowania MMR prowadzą do niestabilności genomowej, sprzyjającej indukcji i rozwojowi procesu kancerogenezy. Najczęściej w systemie MMR dochodzi do mutacji genów z rodziny *MLH* (ang. *human MutL[E. coli] homologue*). Zasadniczymi przyczynami uszkodzenia genu *hMLH1*, prowadzącymi do

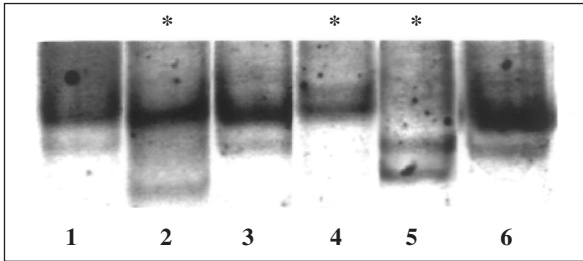
¹Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego;

kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda Małgorzata Krajewska

²Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki;

kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig





Ryc. 1. Przykładowy elektroferogram rozdziału produktów amplifikacji eksonu 8 genu *hMLH1* w raku piersi kobiet

* – preparaty w których zidentyfikowano mutacje

procesu kancerogenezy są mutacje somatyczne, germinalne i modyfikacje epigenetyczne, w wyniku których dochodzi do wyciszenia ekspresji genu na skutek hipermetylacji promotora [5]. Najczęściej identyfikowanymi typami mutacji tego genu są mutacje punktowe, insercje i delecje. Najwyższą częstość występowania tych mutacji stwierdzono w eksonie 8 i 14 genu *hMLH1* [6, 7].

Mutacje genu *MLH1* odgrywają znaczącą rolę w procesie transformacji nowotworowej jelita grubego, niemniej udział tego genu w procesie kancerogenezy innych narządów, w tym piersi kobiet, pozostaje nadal niedostatecznie poznany.

W pracy podjęto próbę analizy eksonów 8 i 14 genu *hMLH1* w aspekcie procesu transformacji nowotworowej piersi kobiet.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 35 archiwalnych preparatów przewodowych raków piersi kobiet (średnia wieku 52 ± 8 lata) oraz 35 preparatów krwi obwodowej pobranych od tych samych pacjentek. Wszystkie nowotwory poddano ocenie histopatologicznej oraz klasyfikacji wg skali Blooma.

DNA z bloczków parafinowych oraz krwi obwodowej izolowano metodą z DNA-zolem (Molecular Research Center, Inc., USA) w modyfikacji własnej. Czystość preparatów DNA określano metodą spektrofotometryczną, analizując widmo pochłaniania w zakresie 230–330 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A_{260}/A_{280} mieszcząca się w granicach 1,8–2,0. Do wykrywania mutacji w eksonie 8 i 14 genu *hMLH1* zastosowano metodę PCR-SSCP. Reakcję PCR prowadzono w 50 μ l mieszaniny reakcyjnej o składzie: 5 μ l 10 x stężonego buforu do reakcji PCR, 3 μ l każdego ze starterów, 0,5 μ l polimerazy Taq o aktywności 5U/ μ l, 1 μ l mieszaniny dNTP o stężeniu 200 μ M, 100 ng DNA, woda do objętości 50 μ l. W reakcji PCR stosowano następujące pary starterów: dla eksonu 8 – 5'-CCTTGIGTCTTCTGCTGTTTG-3'; 5'-GATTTTTT-

TATATAGGTTATCGACA-3' oraz dla eksonu 14 – 5'-AAGTGGGGTTGGTAGGATTCT-3'; 5'-CTCCCTG-GACCATTGTAG-3'. W toku analiz przeprowadzono pozytywne oraz negatywne kontrole w celu wyeliminowania błędów związanych z ewentualnymi zanieczyszczeniami odczynników użytych do badań lub uszkodzeniami matrycy. Po zakończeniu reakcji amplifikacji 5 μ l mieszaniny reakcyjnej mieszało z 5 μ l buforu prowadzącego. Po denaturacji termicznej przez 5 min w 95°C, a następnie inkubacji w lodzie prowadzono rozdział w 12% żelu poliakrylamidowym w buforze TBE, a produkty rozdziału wybarwiano metodą srebrową [8].

Analizę sekwencyjną w preparatach wykazujących mutacje przeprowadzono przy zastosowaniu automatycznego sekwenatora DNA ABI PRISM 377 i programu komputerowego DNA Sequencing Analysis Software v. 3.4.1.

Wyniki

Analiza mutacji w genie *hMLH1* wykonana została przy zastosowaniu techniki PCR-SSCP. Do analizy mutacji użyto starterów warunkujących amplifikację całego eksonu i przylegających regionów na granicy ekson/intron. W przypadku eksonu 8 amplifikowano fragment o długości 146 pz, natomiast dla eksonu 14 zastosowano startery obejmujące 225 pz.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono występowanie mutacji wyłącznie w eksonie 8 genu *hMLH1* w 8% (3/35) przebadanych nowotworów piersi kobiet. Wszystkie 3 preparaty ze zidentyfikowaną mutacją w genie *hMLH1* zostały sklasyfikowane na II^o wg systemu Blooma. Przykładowy elektroferogram rozdziału produktów amplifikacji eksonu 8 przedstawia ryc. 1.

Analizy sekwencyjnej preparatów ze stwierdzoną mutacją w eksonie 8 genu *hMLH1* dokonano przy użyciu zestawu do automatycznego sekwencjonowania *ABI Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems).

W 2 badanych przypadkach wykazano w eksonie 8 substytucję w kodonie 219 (ATC→GTC; Ile→Wal), natomiast w jednym preparacie stwierdzono substytucję w kodonie 226 (CGA→TGA; kodon terminacyjny).

Dyskusja

Niestabilność mikrosatelitarna (MIN) i mutacje genów mutatorowych (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*) w nowotworach piersi są nadal kwestią kontrowersyjną [9, 10]

Uzyskane przez nas wyniki badań zbliżone są do danych eksperymentalnych, które sugerują, iż w sporadycznych rakach piersi mutacje genów MMR, w tym także *hMLH1* są stosunkowo rzadkie i nie odgrywają znaczącej roli w procesie transformacji nowotworowej tego narządu [11–14].



Do odmiennych wniosków skłaniają wyniki badań nad utratą heterozygotyczności w genie *hMLH1* w sporadycznych rakach piersi [15]. Zmienność ekspresji *hMLH1* zarówno na poziomie genu, jak i białka oraz istnienie mutacji w genie *hMLH1*, wykazano również w badaniach prowadzonych na liniach komórkowych oraz rodzinnych nowotworach piersi kobiet [16–18]. Mutacje genu *hMLH1* i *hMLH2* przyczyniają się do wzrostu ryzyka zachorowania na nowotwory związane z HNPCC (ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) typu II, do których zaliczane są nowotwory żołądka, jelita grubego, miedniczek nerkowych, moczowodu, jajnika, a także błony śluzowej trzonu macicy [19]. Prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwór endometrium na skutek mutacji genów MMR szacuje się na 20% przed 50. i 60% przed 70. rokiem życia. Mutacje tych genów są także związane z procesem transformacji nowotworowej jajnika. Na raka jajnika związanego z HNPCC choruje 12% kobiet przed 70. rokiem życia. Udział genu *hMLH1* w kancerogenezie zespołu HNPCC II jest bezsporny, natomiast jego związek z rakiem piersi nie jest jednoznaczny [20, 21].

Wyniki badań nad rakiem piersi związanym z zespołem HNPCC, które zostały przeprowadzone przy zastosowaniu techniki PCR-SSCP oraz analizy sekwencyjnej, wskazują na wyższą częstość występowania mutacji w genie *MHL1* niż ma to miejsce w sporadycznych rakach tego narządu. Sugeruje się, że rak piersi rozpatrywany może być jako integralny rak zespołu HNPCC lub jako wynik dziedziczenia mutacji w genach systemu MMR [22].

Opublikowane dotąd badania nie pozwalają sądzić, iż gen *hMLH1* może być rozpatrywany jako marker nowotworów piersi kobiet. Jednak z uwagi na bardzo małą liczbę przebadanych dotychczas przypadków, konieczne jest objęcie badaniami większej liczby pacjentek charakteryzujących się tym samym typem nowotworu oraz stopniem jego zaawansowania.

Pracę wykonano w ramach grantu nr G-7 finansowanego z budżetu Gminy Łódź.

Summary

Purpose: *In order to test the hypothesis that the hMLH1 gene is compromised in the initiation and progression of breast cancer, we have investigated mutations of exon 8 and 14 using PCR-SSCP technique.*

Material and methods: *Paraffin-embedded tumour and peripheral venous blood of 35 patients with breast ductal carcinoma were studied. The single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis of the hMLH1 gene was performed by polymerase chain reaction (PCR). PCR primers were prepared to amplify the full sequence of exons 8 and 14, and exon-intron borders. Samples with identified hMLH1 mutations were sequenced using ABI Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing kit and the ABI Prism 377 sequencer.*

Results and conclusions: *hMLH1 gene mutations were found in 3/35 (8%) studied cases of breast cancer. They were identified in exon 8. No mutations were detected in exon 14. Two sequence variants were identified in hMLH1 gene. One, a ATC→GTC substitution in codon 219 (exon 8) changing isoleucine to valine. The other mutation detected in hMLH1 was a CGA→TGA substitution in codon 226 (exon 8), creating a stop codon, predicted to generate a truncated protein. hMLH1 gene defects involving exon 8 and 14 are extremely rare events and thus seems not to be involved in sporadic breast cancer.*

Key words: *female breast cancer, hMLH1 gene, mutation analysis, PCR-SSCP, automated DNA sequencing, ABI PRISM 377*

Piśmiennictwo

1. Jiricny J. *Eukaryotic mismatch repair: an update.* Mutat Res 1998; 409: 107-21.
2. Prolla TA. *DNA mismatch repair and cancer.* Curr Opin Cell Biol 1998; 10: 311-6.
3. Hsieh P. *Molecular mechanisms of DNA mismatch repair.* Mutat Res 2001; 486: 71-87.
4. Hopfner KP, Tainer JA. *DNA mismatch repair: the hands of a genome guardian.* Structure Fold Des 2000; 8: 237-41.
5. Baylin SB, Herman JG. *DNA hypermethylation in tumorigenesis.* Trends Genet 2000; 16: 168-74.
6. Ronen A, Glickman BW. *Human DNA repair genes.* Environ Mol Mutagen 2001; 37: 241-83.
7. Maliaka YK, Chudina AP, Belev NF, et al. Buerstedde JM. *CpG dinucleotides in the hMSH2 and hMLH1 genes are hotspots for HNPCC mutations.* Hum Genet 1996; 97: 251-255.



8. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels*. Anal Biochem 1991; 196: 80-3.
9. Siah SP, Quinn DM, Bennett GD, et al. *Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing MSI was not detected at 'BAT 25' and 'BAT 26' microsatellite markers in early-onset breast cancer*. Breast Cancer Res Treat 2000; 60: 135-42.
10. Scott RJ, McPhillips M, Meldrum CJ, et al. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds*. Am J Hum Genet 2001; 68: 118-27.
11. Adem C, Soderberg CL, Cunningham JM, et al. *Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancers*. Int J Cancer 2003; 20: 580-2.
12. Osin P, Lu YJ, Stone J, et al. *Distinct genetic and epigenetic changes in medullary breast cancer*. Int J Surg Pathol 2003; 11: 153-8.
13. 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; 26: 171-4.
14. Murata H, Khattar NH, Kang Y, et al. *Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability*. Oncogene 2002; 21: 5696-703.
15. Benachenhou 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.
16. Balogh GA, Russo IH, Russo J. *Mutations in mismatch repair genes are involved in the neoplastic transformation of human breast epithelial cells*. Int J Oncol 2003; 23: 411-9.
17. Hackman P, Tannergard P, Osei-Mensa S, et al. *A human compound heterozygote for two MLH1 missense mutations*. Nat Genet 1997; 17: 135-6.
18. Vasen HF, Morreau H, Nortier JW. *Is breast cancer part of the tumor spectrum of hereditary nonpolyposis colorectal cancer?* Am J Hum Genet 2001; 68: 1533-5.
19. Cook JA. *The genetics and management of inherited gynaecological cancer (including breast)*. Curr Obstet Gynaecol 2000; 10: 133-8.
20. Frank TS, Critchfield GC. *Hereditary risk of women's cancers*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2002; 16: 703-13.
21. Muller A, Edmonston TB, Corao DA, et al. *Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Cancer Res 2002; 62: 1014-9.
22. 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.

Adres do korespondencji

dr Magdalena Bryś
 Katedra Cytobiochemii
 Uniwersytetu Łódzkiego
 ul. Banacha 12/16
 90-237 Łódź
 tel. +48 42 635 44 89
 faks +48 42 635 44 84

