

## Ekspresja genu *MMAC/PTEN* w raku endometrium – badania RT-PCR

### *MMAC/PTEN* gene expression in endometrial cancer – RT-PCR studies

Anna Sobczuk<sup>1</sup>, Beata Smolarz<sup>2</sup>, Hanna Romanowicz-Makowska<sup>2</sup>, Tomasz Pertyński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

<sup>2</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;

kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

Przeгляд Menopauzalny 2007; 6: 344-346

#### Streszczenie

Obecność mutacji w genie *MMAC/PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) stwierdza się w raku piersi, prostaty, jajnika, jelita, czerniaku i raku endometrium.

W prezentowanej pracy badano ekspresję genu *MMAC/PTEN* u kobiet z rakiem endometrium (n=70) w próbkach RNA uzyskanych z tkanek guza. Jako kontrolę zastosowano próbki uzyskane od 68 pacjentek z prawidłowym endometrium. Ekspresja *MMAC/PTEN* była określona przy zastosowaniu techniki odwrotnej transkrypcji sprzężonej z łańcuchową reakcją polimerazową (ang. *reverse transcription-polymerase chain reaction* – RT-PCR).

Ekspresja genu *MMAC/PTEN* w raku endometrium była znacząco niższa w porównaniu z grupą kontrolną (p<0,05). Ponadto zaobserwowano znaczące różnice (p<0,05) między ekspresją *MMAC/PTEN* w stopniu III w porównaniu z innymi stopniami zaawansowania nowotworu.

Wyniki sugerują, że ekspresja genu *MMAC/PTEN* może być związana z wystąpieniem raka endometrium.

**Słowa kluczowe:** *MMAC/PTEN*, ekspresja, sporadyczny rak endometrium, RT-PCR

#### Summary

Mutations in the *MMAC/PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) gene are documented in cancers of the breast, prostate, ovary, colon, melanoma, glioblastoma, lymphoma and endometrium.

In the present work *MMAC/PTEN* gene expression in women with endometrial adenocarcinoma (n=70) in RNA samples obtained from cancer tissue were investigated. Control DNA was obtained from 68 normal endometrial tissue samples. The *MMAC/PTEN* expression was determined by RT-PCR analysis.

Expression of the *MMAC/PTEN* gene in endometrial adenocarcinoma cases was significantly reduced compared to the expression in the normal samples (p<0.05). Furthermore a significant difference (p<0.05) was observed between the expression of *MMAC/PTEN* in stage III versus lower stages of endometrial cancer.

The results support the hypothesis that *MMAC/PTEN* gene expression may be associated with the incidence of endometrial cancer.

**Key words:** *MMAC/PTEN*, expression, sporadic endometrial cancer, RT-PCR

#### Wstęp

W wielu krajach na całym świecie rejestruje się stały wzrost liczby chorych na raka błony śluzowej jamy macicy, w związku z czym choroba ta staje się poważnym problemem diagnostycznym i terapeutycznym. Rocznie odnotowuje się na świecie 150 tys. nowych zachorowań na raka endometrium (najwyższy wskaźnik zachorowa-

ności we Flandrii, region Varese – 247/100 tys., 21 w USA, 2,7 w Japonii) [1]. Wyodrębniono co najmniej dwa typy raków. Typ I to głównie raki endometrioidalne (ang. *endometrioid carcinoma*), stanowią one do 80% raków endometrium i związane są głównie z rozrostem endometrium. Typ II to rzadszy typ nieendometrioidalny, wywodzący się z atroficznego endometrium [1]. Są to najczęściej raki surowicze (ang. *serous*), jasnokomórko-

Adres do korespondencji:

dr med. **Hanna Romanowicz-Makowska**, Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel. +48 42 271 12 80, faks +48 42 271 14 21

we (ang. *clear cell*) lub rzadziej brodawkowe (ang. *papillary*), czy płaskonabłonkowe (ang. *squamous carcinomas*) rozwijające się na podłożu atroficznej tkanki endometrium u starszych kobiet [2].

Czynnikami ryzyka raka endometrium są:

- otyłość,
- źle dobrana terapia hormonalna,
- dieta bogata w tłuszcze,
- cukrzyca,
- nadciśnienie tętnicze,
- predyspozycje rodzinne [3].

Czynniki prognostyczne nie dają jednak pełnego obrazu biologii nowotworu [4]. Dlatego istotne wydaje się badanie i poszukiwanie innych, nowych czynników rokowniczych.

Gen *MMAC/PTEN* jest genem supresorowym zlokalizowanym na chromosomie 10q, kodującym białko fosfatazę (fosfatydyloinozytol 3,4,5-trifosforan fosfatazy) modulującą wzrost komórek i proces apoptozy. Mutacje somatyczne w genie *MMAC/PTEN* stwierdza się w różnych nowotworach. Mutacje somatyczne lub delecje *MMAC/PTEN* wykrywa się w 40–76% raków endometrium [5–8]. W szczególności region 10q23 i 10q25-q26 mogą być silnie związane z kancerogenezą raka endometrium [9, 10]. Mutacje genu *MMAC/PTEN* spotyka się w 22% rozrostów endometrium zarówno bez, jak i z atypią [11, 12].

Kappes i wsp. wykazali znaczące zmniejszenie poziomu ekspresji *MMAC/PTEN* w raku endometrium w porównaniu z prawidłowym endometrium [13].

Dla lepszego zrozumienia wpływu *MMAC/PTEN* w kancerogenezie raka endometrium analizowano ekspresję tego genu u kobiet z rakiem endometrium.

## Materiały i metody

### Pacjentki

Materiał do badań stanowiły bloczki parafinowe pochodzące z archiwum Zakładu Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. W badaniach uczestniczyło 70 kobiet w wieku 58–71 lat (średnia 68 lat). Wszystkie przypadki zostały określone wg

kryteriów FIGO (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics*). Do badań zakwalifikowano 15 nowotworów I stopnia, 43 II stopnia i 12 III stopnia. Grupę kontrolną stanowiły próbki uzyskane z prawidłowego endometrium (n=68).

### Izolacja RNA i reakcja RT-PCR

Izolację mRNA przeprowadzono z zastosowaniem TRIzol<sup>®</sup> Reagents (Invitrogen<sup>™</sup>, San Diego, CA) zgodnie z zaleceniami producenta. cDNA uzyskano w reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu firmy Invitrogen<sup>™</sup>. Sekwencje starterów w reakcji PCR amplifikujące region od 117 do 741 pz były następujące: F1- 5' CAGA-AAGACTTGAAGCGTAT 3' i B1- 5' AACGGCTGAGGGA-ACTC 3'. Startery do amplifikacji  $\alpha$ -enolazy obejmujące region od 77 do 532 pz: EF1- 5' TGGCAGGATGACTTCAGA 3' i EB1- 5' AGTGGCTAGAAGTTCACC 3'. Reakcja PCR została przeprowadzona w DNA Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 2400; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, U.S.A.). Warunki reakcji były następujące 45 s w 94°C, 45 s w 54°C, 1 min w 72°C, powtórzenie 40 cykli. Mieszanka reakcyjna 25  $\mu$ l zawierała 100 ng cDNA, 1  $\mu$ l każdego startera (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) i 1 jednostkę Taq Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Produkt PCR był analizowany w 2-procentowym żelu agarozowym po barwieniu bromkiem etydyny.

## Wyniki

Ekspresję genu *MMAC/PTEN* stwierdzono w 46% przypadków raka endometrium (32/70) i w 62% próbek kontrolnych (42/68). Ekspresja *MMAC/PTEN* w próbkach komórek guza była znacząco zredukowana w porównaniu z poziomem ekspresji w tkankach prawidłowych (p<0,05).

Zależność poziomu ekspresji *MMAC/PTEN* od stopnia zaawansowania nowotworu u pacjentek z rakiem endometrium przedstawiono w tab. I. Ekspresja *MMAC/PTEN* w stopniu III była znacząco zredukowana w porównaniu z niższymi stopniami zaawansowania raka endometrium.

Tab. I. Ekspresja genu *MMAC/PTEN* u chorych na raka endometrium i w grupie kontrolnej

	Ekspresja <i>MMAC/PTEN</i>	
	obecność	brak
grupa kontrolna (n=68)	42 (0,62)	26 (0,38)
pacjentki (n=70)	32 (0,46) <sup>a</sup>	38 (0,54)
stopień I <sup>b</sup> (n=15)	12 (0,80)	3 (0,20)
stopień II (n=43)	18 (0,40)	25 (0,60)
stopień III (n=12)	2 (0,17)	10 (0,83)

<sup>a</sup>p<0,05 w porównaniu z grupą kontrolną, <sup>b</sup>wg FIGO

## Dyskusja

Wiadomo, że rozwój raka endometrium jest związany z akumulacją pewnych specyficznych zmian genetycznych. W procesie nowotworzenia biorą udział 3 główne grupy genów. Zmiany w genach reprezentujących wszystkie klasy zostały zidentyfikowane w rakach endometrium. W warunkach prawidłowych podlegają one kontrolowanej ekspresji podczas embriogenezy, różnicowania i proliferacji komórek, natomiast ich mutacje prowadzą do zaburzenia tych procesów i w konsekwencji do transformacji nowotworowej. Są to:

- onkogeny,
- geny supresorowe,
- geny mutatorowe.

Gen *MMAC/PTEN*, którego mutacje stwierdza się w licznych nowotworach, koduje glikoproteinę o masie 54 kDa, która działa jako specyficzna fosfataza. U ludzi z konstytutywnymi mutacjami *PTEN* stwierdza się dziedziczne predyspozycje do nowotworów złośliwych określane jako choroba Cowdena, charakteryzująca się wysoką częstością raków piersi, tarczycy i innych w połączeniu z *hamartoma* wielu organów. Stwierdza się tendencję zwiększonego ryzyka raka endometrium u kobiet z chorobą Cowdena, lecz prace nad tym zagadnieniem wymagają dalszych badań [8, 9]. *MMAC/PTEN* jest genem często zmutowanym w raku endometrium. Mutacje *MMAC/PTEN* wykrywa się w 33–55% raków endometrium [14–16].

W naszej pracy przeprowadzonej w grupie 70 kobiet z rakiem endometrium zaobserwowano, że ekspresja *MMAC/PTEN* była znacząco niższa u chorych niż w kontroli. Dane literaturowe wskazują, że podobne wyniki zaobserwowano w raku prostaty [17], tarczycy [18] oraz raku piersi [13]. Brak ekspresji może być związany z różnymi mechanizmami. Jedną możliwością jest zmiana metylacji regionu regulującego transkrypcję [6, 7]. W otoczeniu *locus* chromosomu 10 zawierającego gen *PTEN* mogą znajdować się inne geny supresorowe, które mogą ulegać usunięciu wraz z *PTEN*. Jednym z nich jest gen *EMX2* zawierający homeodomenę. Podwyższona ekspresja natywnego genu *EMX2* jest związana z obniżonym tempem proliferacji endometrium, co może zostać przypisane genowi supresorowemu. Delecję *EMX2* obserwuje się w niektórych gruczolakorakach endometrium. [19]. Inną możliwością zaproponowaną przez zespół Li i wsp. jest sytuacja, kiedy identyfikacja *MMAC/PTEN* bazuje na podobieństwie do fosfatazy [20, 21].

Badania autorów niniejszej pracy wskazują, że zmiana ekspresji genu *MMAC/PTEN* może być związana z rozwojem raka endometrium. Do potwierdzenia tego przypuszczenia konieczne są następne badania.

## Piśmiennictwo

1. Sherman M. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 416-18.
2. Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 610-9.

3. Bremond A, Bataillard A, Thomas L, et al. Cancer of the endometrium. French National Federation of Cancer (FNCLCC). *Br J Cancer* 2001; 84: 31-6.
4. Salvanes HB, Akslen LA. Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *APMIS* 2002; 110: 673-89.
5. Kurose K, Bando K, Fukino K, et al. Somatic mutations of the *PTEN/MMAC1* gene in fifteen Japanese endometrial cancers: evidence for inactivation of both alleles. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 842-8.
6. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, et al. *PTEN* mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 3005-10.
7. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barret JC. *PTEN/MMAC1* mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 1997; 57: 4736-8.
8. Simpkins SB, Peiffer-Schneider S, Mutch DG, et al. *PTEN* mutations in endometrial cancers with 10q LOH: additional evidence for the involvement of multiple tumor suppressors. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 391-5.
9. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998; 280: 1036-7.
10. Nagase S, Yamakawa H, Sato S, et al. Identification of a 790-kilobase region of common allelic loss in chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1630-3.
11. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, et al. *PTEN* mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3254-8.
12. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, et al. Mutation of the *PTEN* tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res* 1998; 58: 2500-3.
13. Kappes H, Goemann C, Bamberger AM, et al. *PTEN* expression in breast and endometrial cancer: correlations with steroid hormone receptor status. *Pathobiology* 2001; 69: 136-42.
14. Kong H, Suzuki A, Zou TT, et al. *PTEN1* is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 1997; 17: 143-4.
15. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, et al. Mutations in *PTEN* are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57: 3935-40.
16. Tashiro H, Isacson C, Levine R, et al. *p53* gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 177-85.
17. Whang YE, Wu X, Suzuki H, et al. Inactivation of the tumour suppressor *PTEN/MMAC1* in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5246-50.
18. Frisk T, Foukakis T, Dwight T, et al. Silencing of the *PTEN* tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 74-80.
19. Teng DHF, Hu R, Lin H, et al. *MMAC1/PTEN* mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 5221-5.
20. Li DM, Sun HL. *TEP1*, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor  $\beta$ . *Cancer Res* 1997; 57: 2130-6.
21. Li J, Yen C, Liaw D, et al. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-7.