

Znaczenie polimorfizmu G/C genu *RAD51* u kobiet z rakiem piersi w wieku pomenopauzalnym

The significance of G/C polymorphism of the RAD51 gene in postmenopausal women with breast cancer

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Anna Sobczuk², Tomasz Pertyński²

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

²Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, kierownik Pracowni: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

Przeгляд Menopauzalny 2008; 1: 38–41

Streszczenie

Cel pracy: Rak piersi jest jedną z głównych przyczyn śmierci kobiet na świecie. W prezentowanej pracy badano polimorfizm G/C genu *RAD51* u chorych na raka piersi.

Materiał i metody: Krew do badań uzyskano od 100 kobiet chorych na raka piersi. Stopień zaawansowania nowotworów we wszystkich przypadkach został określony wg skali Scarfa-Blooma-Richardsona. Jako kontrolę zastosowano krew osób (n=106), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej.

Wyniki: Rozkład genotypów polimorfizmu G/C w grupie badanej i kontrolnej nie różnił się znacząco od rozkładu zgodnego z prawem Hardy'ego-Weinberga ($p>0,05$). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów i częstości alleli pomiędzy pacjentkami z przerzutami i bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych.

Wniosek: Wyniki badań autorów wskazują, że polimorfizm G/C genu *RAD51* może nie być bezpośrednio związany z rozwojem raka piersi, jednakże dla potwierdzenia tego przypuszczenia konieczne są badania z udziałem większej populacji chorych.

Słowa kluczowe: *RAD51*, rak piersi, polimorfizm genowy

Summary

Objective: Breast cancer is one of the major killers worldwide. In this study the G/C polymorphism of the *RAD51* gene in women with breast cancer was investigated.

Material and methods: 100 breast cancer women provided blood for mutation analysis. Blood samples from age-matched healthy individuals (n=106) served as controls. The G/C polymorphism was determined by PCR-RFLP methods.

Results: The distribution of genotypes of the G/C polymorphism of *RAD51* in both controls and patients did not differ significantly ($p>0.05$) from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution. There were no significant differences in the genotype distributions and allele frequencies between node-positive and node-negative patients.

Conclusion: Our study implies that it is possible that the G/C polymorphism of the *RAD51* gene may not be directly involved in the development and/or progression of breast cancer, but further research, conducted on a larger population, is needed to clarify this point.

Key words: *RAD51*, breast cancer, gene polymorphism

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

Wstęp

Rak piersi u kobiet występuje niezwykle często, a jego najgroźniejszą cechą jest zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów na inne organy. Przebieg samej choroby jest różny i odmienny u każdej pacjentki. U niektórych przerzuty mogą pojawić się w miarę szybko od rozpoznania choroby, u innych nowotwór rzadko jest spotykany u kobiet przed 30. rokiem życia, ale już po przekroczeniu tego wieku możliwość zachorowania na niego wzrasta lawinowo [1]. Wiele lat obserwacji pozwoliło zauważyć, że rak piersi jest spotykany częściej w krajach rozwiniętych, ale trudno jednoznacznie i definitywnie określić jego przyczyny. Można się również pokusić o hipotezę, że takie wnioski o występowaniu raka piersi w społeczeństwach rozwiniętych wynikają z ubogiej diagnostyki państw biedniejszych, przez co przedstawiane wyniki nie są miarodajne.

Znanych jest obecnie wiele czynników prognostycznych w raku piersi, m.in. typ histologiczny raka, rozmiar guza, stan węzłów chłonnych pachowych, stopień złośliwości histologicznej, czy stopień proliferacji komórek rakowych [2, 3]. Ich obecność wskazuje na złożoność procesu progresji tego nowotworu. Jest mało prawdopodobne, aby analiza zaburzeń jakiegokolwiek jednego genu pozwoliła na wyjaśnienie wszystkich ważnych cech biologicznych nowotworu człowieka. Złośliwy fenotyp jest prawdopodobnie odzwierciedleniem współdziałania produktów wielu genów i z ich obecności lub braku można domyślać się cech biologicznych guza.

Mutacje w genach supresorowych *BRCA1* (ang. *breast cancer susceptibility gene 1*) i *BRCA2* predysponują do rozwoju raka piersi i jajnika. Białka kodowane przez te geny uczestniczą w ważnych procesach komórkowych. Oba białka w szczególności wpływają na naprawę DNA i regulację transkrypcji w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [4–6].

Białka *BRCA1/2* oddziałują z wieloma innymi białkami uczestniczącymi w naprawie DNA poprzez rekombinację homologiczną, m.in. z produktem białkowym genu *RAD51* [7, 8]. Rekombinacja homologiczna jest efektywnym i charakteryzującym się dużą wiernością szlakiem naprawy pęknięć dwuniciowych, wykorzystującym do odtworzenia struktury chromosomu jego nieuszkodzony homolog. *RAD51* wiąże się z jednoniciowym DNA powstającym na końcach podwójnego pęknięcia, co prowadzi do oddziaływania na drugą homologiczną cząsteczkę DNA i w wyniku dwóch *crossing-over* zostają restytuowane dwa prawidłowe dupleksy DNA. *BRCA2* poprzez oddziaływanie z *RAD51* blokuje jego zdolność do wiązania z jednoniciowym DNA, co jest istotne dla procesów prawidłowej replikacji.

Gen *RAD51* jest genem polimorficznym i ze względu na jego wpływ na stabilność genomu i potencjalny związek z kompleksem białek *BRCA1/BRCA2*, które zwiększają zdolność do rozwoju raka piersi, warto określić znaczenie polimorfizmów tego genu dla rozwoju nowotworu.

Dane literaturowe sugerują, że podstawienie guaniny do cytozyny w pozycji 135 genu *RAD51*, tzw. polimorfizm G/C, może być związane z ryzykiem raka piersi wśród chorych z mutacjami w genie *BRCA2* [9, 10].

Cel pracy

Celem pracy było określenie rozkładu genotypów i częstości alleli polimorfizmu G/C genu *RAD51* u kobiet z rakiem piersi.

Materiał i metody

Pacjenci

W badaniach zastosowano krew uzyskaną od 100 kobiet z rakiem piersi typu przewodowego, u których stwierdzono obecność (n=61) lub brak przerzutów (n=39) do okolicznych węzłów chłonnych. U żadnej pacjentki nie stwierdzono przerzutów odległych. Były one w wieku 48–82 lat (średnia wieku 58 lat). Średni rozmiar guza wynosił 20 mm (rozmiar 17–32 mm). Stopień zaawansowania nowotworów został oceniony wg skali Scarfa-Blooma-Richardsona. Badaniu poddano 20 nowotworów I stopnia, 45 II stopnia i 35 III stopnia. Wśród pacjentek bez przerzutów 9 miało nowotwór I stopnia, 16 – II, 14 – III; w przypadku chorych z przerzutami 11 – I, 29 – II, 21 – III. Grupę kontrolną stanowiły próbki krwi pobrane od 106 dobranych wiekowo kobiet, u których nie stwierdzono występowania raka piersi.

Izolacja DNA

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

Analiza polimorfizmu *RAD51*

Polimorfizm G/C genu *RAD51* był określany poprzez reakcję PCR-RFLP ze starterami o następujących sekwencjach: 5' TGG GAA CTG CAA CTC ATC TGG 3' i 5' GCG CTC CTC TCT CCA GCAG 3'. Reakcja PCR przeprowadzona była w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400 thermal cycler. Mieszanina reakcyjna (25 µl) obejmowała 5 ng genomowego DNA, 0,2 µmol każdego ze starterów (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP i 1 U polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Warunki reakcji PCR były następujące: 94°C przez 60 s, 54°C przez 30 s i 72°C przez 40 s, i obejmowały 35 cykli. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym MvaI przez 4 godz. w 37°C amplifikowane fragmenty DNA były rozdzielane w 7-procentowym żelu poliakryloamidowym i po barwieniu bromkiem etydyny obserwowane w świetle UV. Każda próbka przypisywana była do jednego z trzech genotypów: G/G, G/C lub C/C.

Analiza statystyczna

Rejestrowana liczba każdego z genotypów była porównywana z liczbą oczekiwaną na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga z użyciem testu χ^2 . Istotność różnic pomiędzy częstościami alleli i genotypów dla poszczególnych grup oceniana była testem χ^2 ; $p < 0,05$ było określane jako wynik statystycznie znaczący.

Wyniki

W tab. I przedstawiono rozkład genotypów w grupie chorych na raka piersi i w grupie kontrolnej. Oba rozkłady nie różniły się znacząco ($p > 0,05$) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga. Nie stwierdzono różnic w częstościach alleli G i C pomiędzy badanymi chorymi i osobami z grupy kontrolnej.

Rozkład genotypów polimorfizmu G/C RAD51 u chorych z przerzutami i bez przerzutów do węzłów chłonnych zaprezentowano w tab. II. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$).

Nie zanotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy rozkładami genotypów w grupach o różnym stopniu zaawansowania nowotworu a rozkładem przewi-

dywanym przez prawo Hardy'ego-Weinberga ($p > 0,05$). Nie stwierdzono różnic w częstościach alleli G i C pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$).

Dyskusja

W naprawie homologicznej DNA uczestniczy wiele genów kodujących białka zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć, m.in. *RAD50*, *RAD52*, *RAD54* oraz *RAD51*. W pierwszym etapie naprawy poprzez rekombinację homologiczną, po rozpoznaniu przez system naprawczy fragmentu DNA powstałego w wyniku pęknięcia dwuniciowego, jedna z jego nici jest trawiona przez egz nukleazy do wytworzenia jednoniciowego odcinka zawierającego wolny koniec 3', który następnie jest łączony z nieuszkodzonym chromosomem homologicznym. Na podstawie informacji zawartej w nieuszkodzonym DNA zostaje odtworzony przebieg naprawianej cząsteczki.

Wykryto związek pomiędzy transformacją nowotworową i wadliwą naprawą przez rekombinację homologiczną w dziedzicznym raku piersi i jajnika w przypadku genów *BRCA1* i *BRCA2* [6, 11]. Mechanizm ryzyka powstawania raka piersi w wyniku działania *RAD51* nie jest jeszcze do końca poznany. Ludzki gen *RAD51* jest zlokalizowany na chromosomie 15q14-15, gdzie utrata heterozygotyczności jest częsta w raku piersi [12, 13]. Wiadomo, że *RAD51* razem z *BRCA1/BRCA2* uczestniczy w naprawie podwójnych pęknięć DNA [7].

Formowanie kompleksu *BRCA1/BARD1/RAD51* na uszkodzeniach replikującego DNA sugeruje, że białka te umożliwiają zachowanie integralności genomu [6]. Białko *BARD1* (ang. *BRCA1-associated RING domain protein 1*) zostało zidentyfikowane jako białko oddziałujące z domeną *RING BRCA1* [14, 15].

Za jądrową lokalizację *RAD51* wydaje się odpowiadać białko *BRCA2*. W komórkach pozbawionych białka *BRCA2* obserwuje się akumulację aberracji chromosomowych, co sugeruje kluczową rolę tego białka w procesie naprawy podwójnych pęknięć [16, 17].

Stwierdzono, że polimorfizm G/C genu *RAD51* w regionie nieulegającym translacji (5'UTR) jest związany ze zwiększoną zapadalnością na raka piersi wśród osób z mutacjami w genie *BRCA2* [18].

W świetle danych mówiących, że progresja raka piersi może być związana z defektami w białku *RAD51*, wydaje się ważne określenie korelacji pomiędzy polimorfizmem G/C tego genu a klinicznym statusem chorych na raka piersi. Biologiczne znaczenie polimorfizmu G/C *RAD51* nie zostało jeszcze wyjaśnione i podlega dalszym badaniom. Lokalizacja polimorfizmu w regionie 5'UTR genu wskazuje, że może on wpływać na stabilność mRNA i proces translacji, powodując zmianę poziomu białka, które działa w multikompleksie *BRCA1/BRCA2/RAD51* w naprawie DNA. Ponieważ mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* są bezpośrednio związane z rakiem piersi,

Tab. I. Rozkład genotypów G/G, G/C i C/C oraz częstości alleli G i C u pacjentek z rakiem piersi (n=100) i w kontroli (n=106)

Genotypy	Pacjentki z rakiem piersi		Grupa kontrolna	
	liczba	częstość	liczba	częstość
G/G	31	0,31	21	0,20
G/C	40	0,40	48	0,44
C/C	29	0,29	37	0,35
χ^2	3,987 ^a		0,591 ^a	
allel G	102	0,51 ^b	90	0,42
allel C	98	0,49 ^b	122	0,58

^a $p > 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego Weinberga;

^b $p > 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną

Tab. II. Rozkład genotypów G/G, G/C i C/C i częstości alleli G i C u pacjentek z przerzutami (n=61) i bez przerzutów (n=39) do okolicznych węzłów chłonnych

Genotypy	Pacjentki z przerzutami		Pacjentki bez przerzutów	
	liczba	częstość	liczba	częstość
G/G	17	0,28	14	0,36
G/C	24	0,39	16	0,41
C/C	20	0,33	9	0,23
χ^2	2,732 ^a		1,070 ^a	
allel G	58	0,48 ^b	44	0,56
allel C	64	0,52 ^b	34	0,44

^a $p > 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego Weinberga;

^b $p > 0,05$ w porównaniu z grupą bez przerzutów

zmienność genetyczna RAD51 może odgrywać rolę w rozwoju tej choroby. W raku piersi utrata heterozygotyczności RAD51 zachodzi w 32% przypadków [19], a redukcja poziomu białka RAD51 u 30% pacjentów [20].

W prezentowanej pracy skoncentrowano się na analizie polimorfizmu G/C RAD51 u chorych na raka piersi oraz u osób, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Populacja chorych na nowotwór oraz grupa kontrolna były jednorodnie pod względem płci oraz dobrane wiekowo. Nie wykazano związku pomiędzy polimorfizmem G/C a występowaniem raka piersi. Nie stwierdzono znaczących różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy pacjentkami z przerzutami i bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. Sugeruje to brak związku pomiędzy polimorfizmem genu *RAD51* a rozwojem raka piersi. Defekty białek zaangażowanych bezpośrednio w naprawę DNA mają wpływ na zwiększoną podatność na nowotwory. W wielu typach komórek nowotworowych stwierdza się takie defekty, z czym wiąże się zmniejszona zdolność do naprawy uszkodzeń DNA. Wyniki sugerują, że polimorfizm G/C genu *RAD51* może nie być bezpośrednio związany z występowaniem i rozwojem raka piersi, jednakże dla potwierdzenia tego przypuszczenia konieczne są badania z udziałem większej populacji.

Piśmiennictwo

1. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 276-92.
2. Ravaioli 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.
3. Hayes DF. Prognostic and predictive factors for breast cancer: translating technology to oncology. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1596-7.
4. McInerney-Leo A, Biesecker BB, Hadley DW, et al. BRCA1/2 testing in hereditary breast and ovarian cancer families II: impact on relationships. *Am J Med Genet A* 2005; 133: 165-9.
5. Scully R, Chen J, Ochs RL, et al. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997; 90: 425-35.
6. Welch PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 2000; 16: 69-74.
7. Chen JJ, Silver D, Cantor S, et al. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 1752-6.
8. Lo T, Pellegrini L, Venkitaraman AR, Blundell TL. Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51: implications for DNA repair and cancer. *DNA Repair (Amst)* 2003; 2: 1015-28.
9. Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, et al. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 955-60.
10. Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, et al. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3232-6.
11. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000; 408: 429-32.
12. Gonzalez R, Silva JM, Dominguez G, et al. Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 1999; 81: 503-9.
13. Wick W, Petersen I, Schmutzler RK, et al. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 1996; 12: 973-8.
14. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 1996; 14: 430-40.
15. Irminger-Finger I, Soriano JV, Vaudan G, et al. In vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1998; 143: 1329-39.
16. Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 196-206.
17. Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2858-66.
18. Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, et al. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S52-9.
19. Scully R, Xie A. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer predisposition and recombination control. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 237-46.
20. Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R, et al. Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2000; 88: 28-36.