

Niestabilność mikrosatelitarna u kobiet z rakiem endometrium z regionu łódzkiego

Microsatellite instability in women with endometrial cancer from the Lodz region of Poland

Anna Sobczuk¹, Beata Smolarz², Hanna Romanowicz-Makowska², Tomasz Pertyński¹

¹Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;

kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

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

kierownik Pracowni i Zakładu prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

Przeгляд Menopauzalny 2008; 1: 42–45

Streszczenie

Cel pracy: Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) odgrywa ważną rolę w rozwoju różnych nowotworów, w tym raka endometrium. Celem pracy było określenie niestabilności mikrosatelitarnej u 100 kobiet w wieku pomenopauzalnym z rakiem endometrium, w próbkach DNA uzyskanych z guza i krwi pobranych od tej samej pacjentki.

Materiał i metody: Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej (n=100). Niestabilność mikrosatelitarna została określona przy zastosowaniu panelu 5 markerów mikrosatelitarnych dla jednonukleotydomowych i dwunukleotydomowych sekwencji powtórzonych: BAT 25 (*locus* 4q12), BAT 26 (2p16), D2S123 (2p16-p21), D5S346 (5q21-q22) i D17S250 (17q11.2-q12).

Wyniki: Nie stwierdzono różnic w częstości niestabilności mikrosatelitarnych pomiędzy próbkami krwi a próbkami uzyskanymi z guza, pobranych od tej samej pacjentki. Stopień niestabilności mikrosatelitarnej był znacząco wyższy u chorych na raka endometrium [40/100 (40%)] w porównaniu z grupą kontrolną [12/100 (12%)] ($p < 0,05$).

Wniosek: Wyniki sugerują, że niestabilność mikrosatelitarna wydaje się istotna dla rozwoju raka endometrium.

Słowa kluczowe: niestabilność mikrosatelitarna, rak endometrium, markery mikrosatelitarne

Summary

Objective: Microsatellite instability (MSI) seems to be important for the development of various human cancers including sporadic endometrial cancer.

Material and methods: The aim of this study was to evaluate microsatellite instability in 100 postmenopausal women with endometrial cancer in DNA samples obtained from cancer tissue and blood of the same patients. Blood samples from age-matched healthy women served as controls (n=100). MSI was studied at five loci containing single- or dinucleotide repeat sequences and mapping to different chromosomal locations: BAT-25 (at locus 4q12), BAT-26 (2p16), D2S123 (2p16-p21), D5S346 (5q21-q22) and D17S250 (17q11.2-q12).

Results: No differences in the MSI frequencies between blood and cancer tissue obtained from patients were detected. The microsatellite instability status was significantly higher in endometrial cancer tissue [40/100 (40%)] compared to controls [12/100 (12%)] ($p < 0.05$).

Conclusion: The results suggest that microsatellite instability seems to be important in the development of sporadic endometrial cancer.

Key words: microsatellite instability, endometrial cancer, microsatellite markers

Wstęp

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 dia-

gnostycznym i terapeutycznym. W genomie komórek rakowych, w tym raka trzonu macicy, wykryto zaburzenia w sekwencjach mikrosatelitarnych. Sekwencje mikrosatelitarne to krótkie, powtarzające się sekwencje nukle-

Adres do korespondencji:

dr med. **Hanna Romanowicz-Makowska**, Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel +48 42 271 12 80, e-mail: smolbea@wp.pl

otyldów, rozsiane w warunkach prawidłowych w całym genomie. Za zmiany te określane mianem niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych (ang. *microsatellite instability* – MSI) jest odpowiedzialny uogólniony defekt mechanizmów odpowiadających za wierność replikacji DNA lub za poreplikacyjną naprawę DNA [1]. Defekty tego typu pojawiają się w wyniku mutacji genów mutatorowych MMR (ang. *mismatch repair*), biorących udział w naprawie nieprawidłowo sparowanych zasad DNA oraz zasad niesparowanych, powstających wskutek insercji lub delecji.

Badania wskazują, że MSI odgrywa ważną rolę w rozwoju różnych nowotworów [2–4], w tym raka endometrium [5–8].

Rak endometrium należy do najczęstszych nowotworów złośliwych rozwijających się w trzonie macicy [9]. Rak błony śluzowej trzonu macicy występuje w 80% w okresie pomenopauzalnym. Tylko 5% zachorowań na ten nowotwór notuje się przed 40. rokiem życia. Zajmuje on czwarte miejsce wśród zachorowań na raka u kobiet [10]. Rocznie odnotowuje się na całym świecie ok. 150 tys. nowych zachorowań na raka endometrium.

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) po raz pierwszy została wykryta u rodzin z zespołem HNPCC (ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) [11, 12]. Za jej powstawanie odpowiedzialny jest defekt w genach naprawczych. W 90% przypadków HNPCC mutacje germinalne mają miejsce w genach *MSH2* i *MLH1* [13]. Jednym z częściej występujących nowotworów w koincydencji z rakiem jelita grubego jest rak endometrium. W genomie jego komórek dochodzi często do MSI pod wpływem uszkodzeń w genach mutatorowych [14, 15]. Poza tym wiadomo, że niestabilność mikrosatelitarną spotyka się w 9–45% sporadycznych przypadków raka trzonu macicy [16, 17]. W prezentowanej pracy przeprowadzono analizę genetyczną niestabilności mikrosatelitarnych u chorych na raka endometrium. W celu analizy MSI zastosowano panel 5 markerów (wg kryterium Bethesda) [18]; 2 jednonukleotydowe powtórzenia (BAT25 i BAT26) oraz 3 dwunukleotydowe powtórzenia (D2S123, D5S346 i D17S250).

Materiał i metody

Pacjentki z rakiem endometrium

Materiał do badań w postaci próbek krwi pobranej na cytrynian oraz wycinków z guza endometrium został uzyskany od 100 pacjentek z rakiem endometrium w wieku pomenopauzalnym. Pacjentki mieściły się w przedziale wiekowym 55–82 lat (średnia wieku \pm SD, 68,8 \pm 6,68 roku). Wszystkie nowotwory sklasyfikowano wg kryteriów ustalonych przez FIGO (ang. *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*).

Grupa kontrolna

Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet (n=100), u których nie stwierdzono choroby nowotworowej.

Izolacja DNA

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

Analiza niestabilności mikrosatelitarnych

Próbki genomowego DNA uzyskane od kobiet z rakiem endometrium i kontrolnego DNA zostały poddane analizie z zastosowaniem panelu 5 markerów mikrosatelitarnych dla jednonukleotydowych i dwunukleotydowych sekwencji powtórzonych: BAT 25 (locus 4q12), BAT 26 (2p16), D2S123 (2p16-p21), D5S346 (5q21-q22) and D17S250 (17q11.2-q12) [18]. Wszystkie sekwencje starterów uzyskano z komputerowej bazy danych Genome DataBase (GDB, at: <http://www.gdb.org>). Warunki reakcji polimerazy łańcuchowej (PCR) podano w tab. I.

Reakcja PCR została przeprowadzona w termocyklicyze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400. Mieszanka reakcyjna (25 μ l) obejmowała 5 ng genomowego DNA, 0,2 μ mol każdego startera (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Niemcy), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM

Tab. I. Sekwencje starterów

Marker	Sekwencje starterów	Warunki reakcji PCR
BAT25	TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT TCT GGA TTT TAA CTA TGG CTC	8 cykli 95°C przez 1 min, 56°C przez 45 s, 72°C przez 45 s
BAT26	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC	2 cykle 95°C przez 45 s, 55°C przez 1 min, 72°C przez 30 s
D2S123	AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	35 cykli 95°C przez 45 s, 55°C przez 45 s, 72°C przez 45 s
D5S346	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG AGC AGA TAA GAC AAG TAT TAC TAG	30 cykli 95°C przez 1 min, 57°C przez 45 s, 72°C przez 45 s
D17S250	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	35 cykli 95°C przez 45 s, 55°C przez 45 s, 72°C przez 45 s

dNTP i 1 U Taq Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Produkt PCR podlegał elektroforezie denaturującej w 8-procentowym żelu poliakrylamidowym i był wizualizowany przez barwienie srebrem. Pacjentki, których próbki DNA wykazywały allele nieobecne w kontrolnym DNA, były klasyfikowane jako MSI pozytywne.

Analiza statystyczna

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

Wyniki

Próbka była klasyfikowana jako przypadek o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej (ang. *MSI-high* – *MSI-H*), jeśli dwa lub więcej markerów wykazywało niestabilność, natomiast o niskim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej (ang. *MSI-low* – *MSI-L*), jeśli jeden marker wykazywał niestabilność w porównaniu z kontrolnym DNA. Próbkę, w których nie stwierdzono niestabilności mikrosatelitarnej, definiowano jako MSI stabilne (ang. *MS-stable* – *MSS*).

Przebadano 100 pacjentek z rakiem endometrium oraz 100 kobiet z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic w niestabilności mikrosatelitarnej pomiędzy próbkami DNA uzyskanymi z guza a próbkami DNA otrzymanymi z krwi, pochodzącymi od tej samej pacjentki. Czterdzieści ze 100 pacjentek (40%) wykazywało niestabilność mikrosatelitarną przy zastosowaniu pełnego panelu 5 markerów; 30 pacjentek zostało zaklasyfikowanych jako przypadki o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej, a 10 jako przypadki o niskim stopniu niestabilności (tab. II).

Wykazano, że obecność MSI u chorych na raka endometrium jest wyższa niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$).

Dyskusja

Proces rozwoju raka endometrium ciągle nie jest do końca poznany. Wiadomo, że powstawanie nowotworu jest wynikiem akumulacji wielu zmian genetycznych [19]. W procesie nowotworzenia biorą udział trzy główne grupy genów. 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 powstające z protoonkogenów w wyniku mutacji o charakterze dominującym, co oznacza, że produkt zmutowanego allelu wykazuje wyższą aktywność niż produkt allelu niezmutowanego z tej samej pary genów,
- geny supresorowe, których mutacje recesywne, a więc ujawniające się tylko wówczas, gdy zachodzą w obydwu kopiach genu, są odpowiedzialne za fenotyp nowotworowy,
- geny mutatorowe, których mutacje są odpowiedzialne za częstotliwość pojawiania się mutacji w genomie (geny kodujące enzymy kontrolujące wierność replikacji i naprawy DNA).

Defekty w funkcjonowaniu genów mutatorowych prowadzą do powstawania niestabilności mikrosatelitarnych. Dane literaturowe wskazują, że MSI może odgrywać ważną rolę w patogenezie i progresji raka endometrium [20–24].

Badania wskazują, że MSI może być markerem tendencji do powstawania błędów replikacyjnych w nowotworach [8, 22, 25]. Defekty w genach naprawczych, takich jak *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* powodują błędy replikacyjne, ujawniające się jako niestabilność markerów mikrosatelitarnych. Wykazano, że utrata ekspresji genu *MLH1* jest częstym zjawiskiem w raku endometrium

Tab. II. Liczba przypadków niestabilności mikrosatelitarnej u kobiet z rakiem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną

Pacjentki z rakiem endometrium (n=100)					
markery MSI wg kryteriów Bethesda					
MSS			MSI+		
MSI-L			MSI-H		
markery pozytywne [0]	markery pozytywne [1]	markery pozytywne [2]	markery pozytywne [3]	markery pozytywne [4]	markery pozytywne [5]
n=60 (0,60)*	n=10 (0,10)	n=0	n=10 (0,10)	n=0	n=20 (0,20)
Grupa kontrolna (n=100)					
markery MSI wg kryteriów Bethesda					
markery pozytywne [0]	markery pozytywne [1]	markery pozytywne [2]	markery pozytywne [3]	markery pozytywne [4]	markery pozytywne [5]
n=88 (0,88)*	n=8 (0,08)	n=4 (0,04)	n=0	n=0	n=0

* $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną

[26–28]. W nowotworach endometrium z wysokim stopniem niestabilności mikrosatelitarnej stwierdzono utratę ekspresji genu *MLH1*, podczas gdy utrata ekspresji tego genu była mniej częstsza w przypadkach niskiego indeksu MSI. Ponieważ patologiczna ekspresja genu *MLH1* nie występuje we wszystkich nowotworach z pozytywnym indeksem MSI, sugeruje to, że w tym procesie mogą uczestniczyć inne geny naprawcze [28].

W prezentowanej pracy wykazano związek pomiędzy występowaniem raka endometrium a obecnością MSI – 40% chorych wykazywało MSI w przeciwieństwie do 12% osób z grupy kontrolnej.

Badania genetyczne wskazują, że w raku endometrium są wykrywane zmiany genetyczne, takie jak mutacje *p53*, utrata heterozygotyczności LOH czy zaburzenia amplifikacji genów *K-ras*, *PTEN* oraz *Her2/neu* [29]. Badania autorów niniejszej pracy potwierdziły fakt, że z tym nowotworem związana jest niestabilność mikrosatelitarna.

Wysoka częstość występowania MSI u kobiet z rakiem endometrium dostarcza motyw do jej zastosowania jako markera wykrywania grupy wysokiego ryzyka wystąpienia tego nowotworu. Do potwierdzenia tego przypuszczenia konieczne są kolejne badania, które obejmą większą grupę.

Praca powstała w oparciu o grant nr 6P05E12220 uzyskany z Komitetu Badań Naukowych (KBN).

Piśmiennictwo

- Lothe RA. Microsatellite instability in human solid tumours. *Mol Med Today* 1997; 3: 61-8.
- 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.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
- Pinto M, Oliveira C, Machado JC, et al. MSI-L gastric carcinomas share the hMLH1 methylation status of MSI-H carcinomas but not their clinicopathological profile. *Lab Invest* 2000; 80: 1915-23.
- Chadwick RB, Pyatt RE, Niemann TH, et al. Hereditary and somatic DNA mismatch repair gene mutations in sporadic endometrial carcinoma. *J Med Genet* 2001; 38: 461-6.
- Furlan D, Casati B, Cerutti R, et al. Genetic progression in sporadic endometrial and gastrointestinal cancers with high microsatellite instability. *J Pathol* 2002; 197: 603-9.
- Muresu R, Sini MC, Cossu A, et al. Chromosomal abnormalities and microsatellite instability in sporadic endometrial cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1802-9.
- Stefansson I, Akslen LA, MacDonald N, et al. Loss of hMSH2 and hMSH6 expression is frequent in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability: a population-based study. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 138-43.
- Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 610-9.
- Brémond A, Bataillard A, Thomas L, et al. Cancer of the endometrium. French National Federation of Cancer (FNCLCC). *Br J Cancer* 2001; 84: 31-6.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-61.
- Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, et al. Microsatellite instability is associated with tumours that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53: 5853-5.
- Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113: 1146-58.
- Muresu R, Sini MC, Cossu A, et al. Chromosomal abnormalities and microsatellite instability in sporadic endometrial cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1802-9.
- Ørbo A, Eklo K, Kopp M. A semiautomated test for microsatellite instability and its significance for the prognosis of sporadic endometrial cancer in northern Norway. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21: 27-33.
- Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman M. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 1671-8.
- Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 462-6.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. 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.
- Mutter GL. Diagnosis of premalignant endometrial disease. *J Clin Pathol* 2002; 55: 326-31.
- Arzimanoglou I, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1808-20.
- Katabuchi H, van Rees B, Lambers I, et al. Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5556-60.
- Parc YR, Halling KC, Burgart LJ, et al. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in young endometrial carcinoma patients: associations with family history and histopathology. *Int J Cancer* 2000; 86: 60-6.
- Liu VW, Yang HJ, Wang Y, et al. High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2003; 89: 697-701.
- Hardisson D, Moreno-Bueno G, Sanchez L, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2003; 16: 1148-58.
- Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, et al. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1986-2002.
- Gurin CC, Federici MG, Kang L, et al. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 462-6.
- Esteller M, Levine R, Baylin SB, et al. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998; 17: 2413-7.
- Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3607-13.
- Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 2004; 4: 213-23.