

Barbara Bobrowska-Korczak, Dorota Skrajnowska, Andrzej Tokarz

GENY *H-RAS1* I *K-RAS1* JAKO POTENCJALNE MARKERY W RAKU PIERSI

Katedra i Zakład Bromatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik prof. WUM dr hab. *A Tokarz*

Celem pracy była ocena wybranych genów pod kątem możliwości ich wykorzystania w charakterze markera w nowotworach piersi w badaniach oddziaływania składników diety na genom, jako wstęp do badań nutrigenomicznych.

Hasła kluczowe: 7,12-dimetylo-1,2-benzoantracen, Hras1, Kras1, nowotwór piersi
Key words: 7,12-dimethyl-1,2-benz[a]anthracene, Hras1, Kras1, breast cancer

W Polsce rak piersi stanowi około 12% wszystkich zachorowań na nowotwory, będąc na pierwszym miejscu wśród nowotworów jako przyczyna zgonów kobiet (1).

Rak piersi może rozwijać się w wyniku łącznego działania czynników genetycznych i środowiskowych. Do transformacji nowotworowej może dojść w wyniku mutacji powstałych w obrębie zarówno protoonkogenów, genów supresorowych, jak również genów kontrolujących apoptozę czy naprawę uszkodzonego DNA. Wśród genów, których mutacje mogą zwiększać ryzyko raka piersi, oprócz *BRCA1* i *BRCA2*, możemy wyróżnić również geny *ATM*, *p53* czy *RAS* (2,3,4).

Produktem genu *RAS* jest monomeryczne białko błonowe o ciężarze 21 kD, należące do rodziny białek związanych z układem GTP/GDP. Białko to uczestniczy w procesach proliferacji, różnicowania i syntezy komórkowej. Mutacje punktowe genów *RAS* przekształcają je w onkogeny. Produkt genu pozostaje wówczas dłużej w formie aktywnej, związanej z GTP i w ten sposób pobudza komórkę do podziału (5,6).

Mimo, iż mutacje w kodonach 12, 59, 61 genu *RAS* występują u ludzi stosunkowo rzadko, tylko w 5% przypadków nowotworów piersi, badanie ich wydaje się bardzo interesujące ze względu na występowanie w raku piersi nadekspresji receptorów licznych czynników wzrostu, które mogą być aktywowane przez *RAS*, szczególnie EGF oraz ErbB-2/neu/Her2 (20-50% przypadków w raku piersi). W badaniach laboratoryjnych prowadzonych z udziałem chemicznie indukowanych guzów piersi zwierząt wykazano występowanie mutacji w genach *ras*, nawet w przypadku 85% badanych próbek (7,8).

Celem badań była ocena występowania mutacji w genach *H-ras1* i *K-ras1* w DNA pochodzącym z guzów nowotworowych szczurów traktowanych w celu wywołania nowotworu piersi 7,12-dimetylobenzoantracenenem (DMBA). Materiałem

kontrolnym było DNA izolowane z tkanek wątroby pochodzących od szczurów nietraktowanych DMBA. Dokonano oceny możliwości wykorzystania wybranych genów w charakterze markerów w badaniach oddziaływania składników diety na genom.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były guzy i tkanki wątroby pochodzące od samic szczurów szczepu Sprague –Dawley. Zwierzęta pochodziły z Pracowni Zwierząt Laboratoryjnych Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania uzyskały zgodę Komisji Etycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Po okresie adaptacji, zwierzęta podzielono na 2 grupy. Pierwsza grupa (grupa badana) otrzymała, w celu wywołania nowotworu sutka, dwukrotnie, w dawce 80 mg/kg masy ciała, sondą dożołądkową 7,12-dimetylobenzoantracen, rozpuszczony w oleju rzepakowym; grupę drugą (grupa kontrolna) stanowiły zwierzęta, które przebywały w identycznych warunkach jak zwierzęta z grupy pierwszej, otrzymywały tą samą dietę, natomiast nie traktowane były DMBA. W badaniu patomorfologicznym, indukowane DMBA guzy zostały zidentyfikowane jako adenocarcinoma sutka. Na ogół rak gruczołowy sutka występował w II i III stopniu złośliwości histologicznej. Nie stwierdzono występowania spontanicznych nowotworów w grupie nie otrzymującej DMBA.

Zwierzęta miały zapewniony ciągły dostęp do wody i paszy (mieszanka LAB-H, wytwórnia pasz Andrzej Morawski). Przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze oraz o kontrolowanym fotookresie noc/dzień (12h/dzień).

Wybór metody procedur analitycznych oznaczania genów *H-ras1* i *K-ras1* został dokonany w oparciu o dane opracowane przez *Cho i współ.* (9) oraz *Freitas i współ.* (10) z kilkoma własnymi modyfikacjami. Chromosomalne DNA z materiału biologicznego wyizolowano metodą opartą o zestaw do izolacji DNA firmy A&A Biotechnology, z kilkoma własnymi modyfikacjami. Produkt reakcji amplifikacji oczyszczano przy pomocy zestawu Clean Up firmy A&A Biotechnology. Reakcje sekwencjonowania prowadzono z użyciem zestawu BigDye v3.1. firmy Applied Biosystems według schematu: warunki reakcji: 96°C 10 s, 50°C 5s, 60°C 4 min – 24 cykle; premix do sekwencjonowania (20 µl): matryca (oczyszczony produkt PCR) 2 µl, primery w stężeniu 1pM 3,2 µl, mix BigDye 4 µl, bufor 4 µl, woda 6,8 µl. Nadmiar znakowanych dideoksynukleotydów z produktów reakcji sekwencjonowania usunięto według instrukcji producenta przy użyciu zestawu Ex Terminator firmy A&A Biotechnology. Następnie denaturacja matrycy w temperaturze 95°C w czasie 5 minut oraz elektroforeza kapilarna w sekwenatorze ABI. Jako kontrolę pozytywną reakcji sekwencjonowano plazmid pGEM.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Podsumowując uzyskane wyniki analizy DNA można stwierdzić, że w zastosowanym modelu badawczym, zarówno w guzach nowotworowych

(u szczurów traktowanych DMBA), jak i tkankach wątroby (w grupie kontrolnej) nie wykryto mutacji w amplifikowanych fragmentach genów *H-ras1* oraz *K-ras1*. Podobne wyniki uzyskali również inni autorzy (8,11,12,13). *Sanchez-Munoz i współ.* (11) wykazali brak występowania mutacji *KRAS* u 35 pacjentów z guzami piersi poddanymi klasyfikacji zgodnie z kryteriami zaproponowanymi przez zespół *Nielsena i współ.* (14). *Koffa i współ.* (8), u pacjentów z nowotworami piersi, zaobserwowali natomiast występowanie mutacji w kodonie 12 genu *K-ras* (157 par zasad) (8/65 próbek, 12,3%), nie wykazując mutacji w genie *H-ras* kodon 12 (312 par zasad). *Hoadley i współ.* (12) również nie stwierdzili w nowotworach piersi występowania mutacji genów *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*. *Samuelson i współ.* (13) na podstawie przeprowadzonych analiz sugerują, że rozwój procesu nowotworowego indukowanego DMBA przebiega niezależnie od mutacji genów *RAS*.

Natomiast odmienne wyniki badań uzyskali w prowadzonych z udziałem zwierząt pracach *Cho i współ.* (9). W guzach piersi, pochodzących od szczurów traktowanych N-metylo-N-nitrozomocznikiem, wykazali bowiem występowanie mutacji w kodonie 12 genu *H-ras* (GGA→GAA) (9/18 guzów, 50%). Zwiększoną ilość mutacji obserwowano w modelu, kiedy zwierzęta dodatkowo otrzymywały akryloamid (23/28, 82% guzów). W żadnej z badanych grup nie wykryto mutacji w kodonach 13 i 61. Yu i *współ.* (15) stwierdzili mutacje w kodonach 12 i 13 genu *H-ras* w przypadku guzów piersi indukowanych u szczurów 2-amino-1-metylofenyloimidazo[4,5-b]pirydyną (PhIP). Na podstawie przedstawionych przykładów wydaje się, że występowanie mutacji genów *Kras* i *Hras* w modelu na zwierzętach z zastosowaniem 7,12-dimetylobenzoantracenu jest znacznie rzadsze, w porównaniu do modeli z użyciem innych związków chemicznych indukujących nowotwory piersi.

W badaniach przeprowadzonych przez zespół *Hollestelle i współ.* (16) stwierdzono występowanie 8 mutacji *RAS* w 7 z 40 (18%) badanych linii komórkowych raka piersi: zidentyfikowano 5 linii z mutacją *KRAS* (MDA-MB-134VI, SK-BR-7, SUM229PE, MPE 600, MDA-MB-231), 2 linie z mutacją *HRAS* (Hs578T, SUM159 PT) i 1 linię (SK-BR-7) z mutacją *NRAS*.

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań można stwierdzić, że występowanie mutacji w genach *K-ras1* i *H-ras1* jest zjawiskiem rzadko występującym i dlatego mało charakterystycznym w przypadku nowotworów piersi, indukowanych chemicznie za pomocą DMBA, co dyskwalifikuje zastosowany model badawczy do badań nutrigenomicznych. Duże nadzieje wiąże się jednak z badaniami tych genów zarówno pod kątem możliwości wykorzystania ich w diagnostyce, prognozowaniu, jak i nutrigenomicie szczególnie w nowotworach trzustki, jelita grubego, tarczycy (5,6,17,18).

B. Bobrowska-Korczak, D. Skrajnowska, A. Tokarz

H-RASI AND *K-RASI* AS POTENTIAL MARKERS IN THE BREAST CANCER

Summary

The aim of the present study was to assess the feasibility of using genes to diagnose early stages and the risk of development of breast cancer, as well as to assay the possibilities of using them in character of the marker in examinations of elements of the diet to the genome as the admission to nutrigenomic examinations.

PIŚMIENNICTWO

1. Smolarz B., Romanowicz-Makowska H., Kozłowska E., Zdrożny M., Stetkiewicz T., Pertyński T., Kulig A.: Niestabilność mikrosatelitarna w raku piersi. *Prz. Menopauz.*, 2004; 6: 40-46.- 2. Korniszewski L.: Genetyka Medyczna, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2009.- 3. Song M., Lee K-M., Kang D.: Breast cancer prevention based on gene-environmental interaction. *Mol. Carcinogen.*, 2011; 50: 280-290.- 4. Domagała W.: Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. *Pol. Prz. Neurol.*, 2007; 3 (3): 127-131.- 5. Friday B.B., Adjei A.A.: K-ras as target for cancer therapy. *Biochem. Bioph. Acta*, 2005; 1756: 127-144.- 6. Olakowski M.: Przydatność oznaczania mutacji genu K-ras w diagnostyce raka trzustki. *Gastroenterol. Pol.*, 2008; 15 (1): 43-48.- 7. von Lintig F.C., Dreilinger A.D., Varki N.M., Wallace A.M., Casteel D.E., Boss G.R.: Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Tr.*, 2000; 62: 51-62.- 8. Koffa M., Malamou-Mitsi V., Agnantis N.J., Spandidos D.A.: Mutational activation of K-ras oncogene in human breast tumors, *Int. J. Oncol.*, 1994; 4: 573-579.- 9. Cho Y-M., Imai T., Hasumura M., Watanabe N., Ushijima T., Hirose M., Nishikawa A.: Increased H-ras mutation frequency in mammary tumors of rats initiated with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and treated with acrylamide. *J. Toxicol. Sci.*, 2009; 34: 407-412.- 10. Freitas R.N., Brasileiro-Filho G., Silva M.E., Pena S.D.J.: Bracken fern-induced malignant tumors in rats: absence of mutations in p53, H-ras, and K-ras and no microsatellite instability. *Mutat. Res.*, 2002; 499: 189-196.- 11. Sanchez-Munoz A., Gallego E., de Luque V., Perez-Rivas L.G., Vicioso L., Ribelles N., Lozano J., Alba E.: Lack of evidence for KRAS oncogenic mutations in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 2010; 10:136.- 12. Hoadley K.A., Weigman V.J., Fan C., Sawyer L.R., He X., Troester M.A., Sartor C.I., Rieger-House T., Bernard P.S., Carey L.A., Perou C.M.: EGFR associated expression profiles vary with breast tumor. *BMC Genomics*, 2007; 8: 258.- 13. Samuelson E, Nilsson J., Walentinsson A., Szpirer C., Behboudi A.: Absence of Ras mutations in rat DMBA-induced mammary tumors. *Mol. Carcinogen.*, 2009; 48(2): 150-155.- 14. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K., Cheang M., Karaca G., Hu Z., Hernandez-Boussard T., Livasy C., Cowan D., Dressler L., Akslen L.A., Ragaz J., Gown A.M., Gilks C.B., van de Rijn M., Perou C.M.: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10 (16): 5367-5374.- 15. Yu M., Snyderwine E.G.: H-ras oncogene mutations during development of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5]pyridine (PhIP)-induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis*, 2002; 23(12): 2123-2128.- 16. Hollestelle A., Elstrodt F., Nagel J.H., Kallemeijn W.W., Schutte M.: Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.*, 2007; 5(2): 195-201.- 17. Laghi L., Orbetegli O., Bianchi P., Zerbi A., di Carlo V., Boland C.R., Malesci A.: Common occurrence of multiple K-RAS mutations in pancreatic cancers with associated precursor lesions and in biliary cancers. *Oncogene*, 2002; 21: 4301-4306.- 18. Karapetis C.S., Khambata-Ford S, Jonker D.J., O'Callaghan C.J., Tu D., Tebbutt N.C., Simes R.J., Chalchal H., Shapiro J.D., Robitaille S., Price T.J., Shepherd L., Au H-J., Langer C., Moore M.J., Zalcberg J.R.: K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359, 1757-1765.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.

Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego własnego nr N N405358339 finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego