

Genetyczne badania skryningowe predyspozycji do nowotworów piersi i jajnika na Warmii i Mazurach w 2007 roku

Jarosław Turek^{1,2}, Paweł Brzuzan², Maciej Woźny²

Cel. W przypadku wystąpienia choroby nowotworowej, diagnostyka mutacji w obrębie genu *BRCA1* u chorych może być bardzo przydatna dla lekarza onkologa przy wyborze odpowiedniej terapii. Głównym celem pracy jest doniesienie o postępach profilaktycznych badań molekularnych, finansowanych przez Warmińsko-Mazurski oddział NFZ. Dodatkowo, proponujemy nową metodę detekcji mutacji 5382insC genu *BRCA1*, opartą na działaniu fluorescencyjnych sond, w układzie Real-Time PCR.

Materiał i metody. W sumie przebadano 316 chorych, u których przynajmniej u jednej osoby w rodzinie wykryto zmiany nowotworowe piersi lub jajników. Nosiciele mutacji genu *BRCA1* zostali zidentyfikowani dzięki wykorzystaniu techniki multiplex PCR i analizy restrykcyjnej produktu, pozwalającej na jednoczesne wykrycie mutacji *BRCA1*: 5382insC, C61G oraz 4153delA. W celu sprawdzenia użyteczności nowo-zaproponowanej metody, podgrupa wcześniej zdiagnozowanych chorych została poddana badaniu na obecność mutacji 5382insC.

Wyniki. Spośród przebadanych 316 chorych z grupy podwyższonego ryzyka, 26 osób (8,2%) sklasyfikowano jako nosicieli mutacji genu *BRCA1*; wśród nich 5 z mutacją 5382insC, powiązaną bezpośrednio z chorobą. Z sukcesem zastosowano zaproponowaną metodę detekcji mutacji 5382insC genu *BRCA1*.

Wnioski. Nasze wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia na temat występowania mutacji genu *BRCA1* w populacji. Uważamy, że badania przesiewowe populacji na obecność najczęściej spotykanych mutacji stanowią najbardziej efektywną formę diagnostyki.

Genetic screening for breast and ovary cancer predisposition in the Warmia and Mazury region of Poland in the year 2007

Objective. Finding mutations in *BRCA1* gene can be informative for oncologists so as to decide which treatment to implement in case of cancer occurrence. The main objective of this paper is to report on the progress of the anti-cancer prophylactic program financed by the Warmia and Mazury department of the Polish National Health Fund. In addition, we propose a new method for detection of the 5382insC mutation in *BRCA1* gene which is based on allelic discrimination with fluorescent probes applied in Real-Time PCR system.

Material and methods. A total of 316 patients with at least one family member diagnosed with breast/ovary cancer were tested. Carriers of the *BRCA1* mutations were identified using multiplex specific PCR, followed by restriction enzyme analysis, which enabled simultaneous detection of 5382insC, C61G and 4153delA mutations in the *BRCA1* gene. To test for the usefulness of the proposed Real-Time PCR assay, a subsample of previously examined patients were subjected for genetic screening of the 5382insC mutation.

Results. Within the group of 316 patients with a family history of breast and/or ovarian cancer 26 (8.2%) persons were diagnosed as *BRCA1* mutants; disease-associated *BRCA1* 5382insC mutation was detected in 5 patients. The new protocol for *BRCA1* 5382insC allelic discrimination using Real-Time PCR assay and TaqMan® probes was successfully applied.

Conclusions. Our results confirm previous reports on mutation occurrence. We conclude that pre-screening by an assay for the mutations most frequently seen in a given population represents an effective line of analysis.

Słowa kluczowe: rak sutka, *BRCA1*, badania skryningowe, Real-Time PCR

Key words: breast cancer, *BRCA1*, genetic screening, Real-Time PCR

¹ Warmińsko-Mazurskie Centrum Onkologii ZOZ MSWiA

² Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wstęp

Rak piersi jest jednym z najistotniejszych problemów zdrowotnych wśród kobiet w Polsce. Ocenia się, że w ciągu całego życia co czternasta Polka zachoruje na ten nowotwór. W 2003 roku raka piersi zdiagnozowano u 11 700 kobiet, z których 5000 zmarło [1]. Nowotwór ten jest najczęstszą przyczyną zgonu wśród kobiet w wieku 40-54 lat.

Wysoka zachorowalność na raka piersi może być związana z czynnikami genetycznymi, a zwłaszcza z występowaniem mutacji w genach *BRCA*. Aż do 5% przypadków raka piersi wiąże się z mutacjami dotyczącymi linii germlinalnej w obrębie genów *BRCA1* i *BRCA2*. Ponadto mutacje w zakresie genów *BRCA* wiążą się z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika, przy czym w Polsce rejestruje się rocznie aż 3000 nowych zachorowań na ten nowotwór.

Geny odpowiedzialne za podwyższone ryzyko zachorowania na nowotwory można podzielić na dwie grupy [2]: geny „portierzy”, kodujące cząsteczki bezpośrednio kontrolujące progresję cykli komórkowych i inaktywacja których wystarcza dla zapoczątkowania wzrostu guza oraz geny „dozorcy”, kodujące cząsteczki odpowiedzialne za wykrywanie uszkodzeń DNA i uczestniczące w procesach naprawczych DNA. Unieczynnienie genów „dozorców” prowadzi zazwyczaj do kumulacji innych defektów genetycznych i genetycznej destabilizacji. Zazwyczaj przyjmuje się, że geny *BRCA* należą do grupy „dozorców” [3]. Kodują one bardzo duże cząsteczki białka, których ekspresja zachodzi w różnych tkankach, głównie podczas fazy G₁/wczesnej fazy S cyklu komórkowego [4, 5]. Zazwyczaj znajdują się one w obrębie jądra komórkowego [6, 7] i uczestniczą w wielu procesach, np. w naprawie uszkodzeń podwójnej wstążki DNA [8, 9], w procesach regulujących transkrypcję genów [10, 11] oraz w procesach kontrolujących cykl komórkowy.

Kompleksowe badanie genów *BRCA* obejmuje sekwencjonowanie całego obszaru kodowania zarówno genu *BRCA1*, jak i *BRCA2*. Procedura ta jest zbyt kosztowna, jak na możliwości nawet najzamożniejszych krajów i nie może być rutynowo stosowana poza państwami Europy i Ameryki Północnej. Ze względu na fakt, że społeczeństwo polskie cechuje znaczna homogenność genetyczna, możliwe było znalezienie najczęstszych mutacji odpowiadających za zachorowania na raka piersi i raka jajnika. Po przeprowadzeniu badania przesiewowego 200 rodzin, w których stwierdzono co najmniej trzy przypadki raka piersi/jajnika, możliwe było wyodrębnienie najczęstszych wariacji genowych: 5382insC, C61G i 4153delA [12], wszystkie stwierdzone w genie *BRCA1* [13]. Od momentu dokonania tych ustaleń poszukiwanie trzech wymienionych wyżej mutacji zostało uznane za złoty standard w rutynowych badaniach przesiewowych w kierunku raka piersi/jajnika. Stwierdzenie mutacji w obrębie genu *BRCA1* może stanowić cenną z punktu widzenia onkologa informację co do wyboru ewentualnego leczenia w razie stwierdzenia nowotworu piersi/jajnika [14].

Praca niniejsza ma na celu przedstawienie osiągnięć Narodowego Programu Walki z Rakiem, finansowanego przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Przedstawiamy w niej także nową metodę wykrywania mutacji 5382insC w genie *BRCA1*. Metoda ta, oparta na dyskryminacji allelicznej polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), opiera się na działaniu fluorescencyjnych sond, w układzie Real-Time PCR.

Materiał i metody

Grupa badana i grupa kontrolna

Pacjenci uczestniczący w badaniu dobierani byli na podstawie rozmowy z genetykiem-onkologiem. Aby zostać objętym opieką w ramach Narodowego Programu Walki z Rakiem w rodzinie chorego/chorej musiał wystąpić przynajmniej jeden przypadek raka piersi/jajnika. W sumie badaniem objęto 316 pacjentów (285 kobiet i 31 mężczyzn). Średnia wieku badanych wyniosła 49,6 lat.

Detekcja mutacji *BRCA1*

DNA izolowano ze świeżej krwi, używając zestawów kolumnowych firmy A&A Biotechnology (Gdynia, Polska). Skuteczność ekstrakcji była zadowalająca i pozwoliła na uzyskanie dobrych produktów łańcuchowej reakcji polimerazowej.

Nosiciele mutacji genu *BRCA1* identyfikowano stosując złożone specyficzne polimerazowe reakcje łańcuchowe, a następnie enzymy restrykcyjne. Pozwalało to na jednoczesną detekcję mutacji 5382insC, C61G i 4153delA w genie *BRCA1* (numer patentu P-335917). Warunki podczas złożonych polimerazowych reakcji łańcuchowych obejmowały 94°C przez 2 minuty; następnie 94°C przez 20 s, 68°C przez 25 s z obniżeniem temperatury o 1,2°C w kolejnych cyklach oraz utrzymanie temperatury 72°C przez 30 s, w 10 cyklach oraz 94°C przez 20 s, 58°C przez 25 s oraz 72°C przez 30 s w 32 cyklach; oraz 72°C przez 7 min. Wszystkie produkty polimerazowej reakcji łańcuchowej były rozdzielane metodą elektroforezy na 2% żelu agarowym, z zastosowaniem bromku etydyny celem wykrycia zmienionych prążków we fragmentach eksonów 20 i 11. Fragmenty DNA były uwiadczniane w ultrafioletcie i porównywane z próbkami uzyskanymi od grupy kontrolnej. W celu przeprowadzenia analizy mutacji C61G produkty złożonej polimerazowej reakcji łańcuchowej były trawione enzymem restrykcyjnym *AvaII* przed elektroforezą na 2% żelu agarowym.

Na potrzeby niniejszego badania opracowaliśmy metodę detekcji mutacji 5382insC w genie *BRCA1* i stosowaliśmy ją jako uzupełnienie opisanej metody. Wspomniana technika opiera się na dyskryminacji allelicznej, z zastosowaniem fluorescencyjnych sond w systemie Real-Time PCR Primery (forward, 5382insC-F: 5'-GAA ACC ACC AAG GTC CAA AGC-3'; reverse, 5382insC-R: 5'-AAA ATG AAG CGG CCC ATC T-3'). Dwie fluorescencyjne sondy TaqMan® (naturalny genotyp, 5382insC-WT: 5'-Fam-AGC AAG AGA ATC CCA GGA CAG AA-BHQ1-3'; mutant, 5382insC-MU: 5'-Tamra-AGC AAG AGA ATC CCC AGG ACA GA-BHQ2-3') zostały zaprojektowane w oparciu o ludzkie sekwencje genu *BRCA1*, dostępne w GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Wszystkie oligonukleotydy zaprojektowano z zastosowaniem programu Primer Express (Applied Biosystems; Foster City, CA) i zakupiono w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

W celu oceny przydatności metody wyłoniono podgrupę składającą się z ośmiu uprzednio zbadanych pacjentów (n=8; 3 z mutacją i 5 o naturalnym genotypie), którą poddano przesiewowemu badaniu genetycznemu na obecność mutacji 5382insC. Amplifikacja w systemie Real-Time PCR została przeprowa-

dzona z zastosowaniem 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), a każde 20 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierało 10 μ l TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 μ M obu primerów, 0,25 μ M obu sond TaqMan® i 100 ng DNA jako tła. Reakcja przebiegała w następujących warunkach: 50°C przez 2 min, 95°C przez 10 min, następnie 50 cykli w 95°C przez 15 s i 60°C przez 1 min. Reakcje prowadzono podwójnie, a płytki reakcyjne nie zawierały kontroli tła (NTCs), w celu wyeliminowania możliwości powstania krzyżowych zanieczyszczeń. Po wykonaniu badań końcowe wartości fluorescencji dla każdej sondy TaqMan® zostały naniesione obok siebie na wykresie punktowym w celu uwidocznienia skupisk odpowiadających poszczególnym próbkom i umożliwienia detekcji mutacji typu 5382insC.

W celu zweryfikowania jakości produktów polimerazowej reakcji łańcuchowej wykonano dodatkową elektroforezę próbek w standardowym żelu agarowym, a następnie uwidoczniono je jako pojedyncze amplikony o przewidywanym zakresie długości. Następnie zweryfikowano jakość produktów polimerazowej reakcji łańcuchowej, przeprowadzając ich sekwencjonowanie w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

Wyniki i omówienie

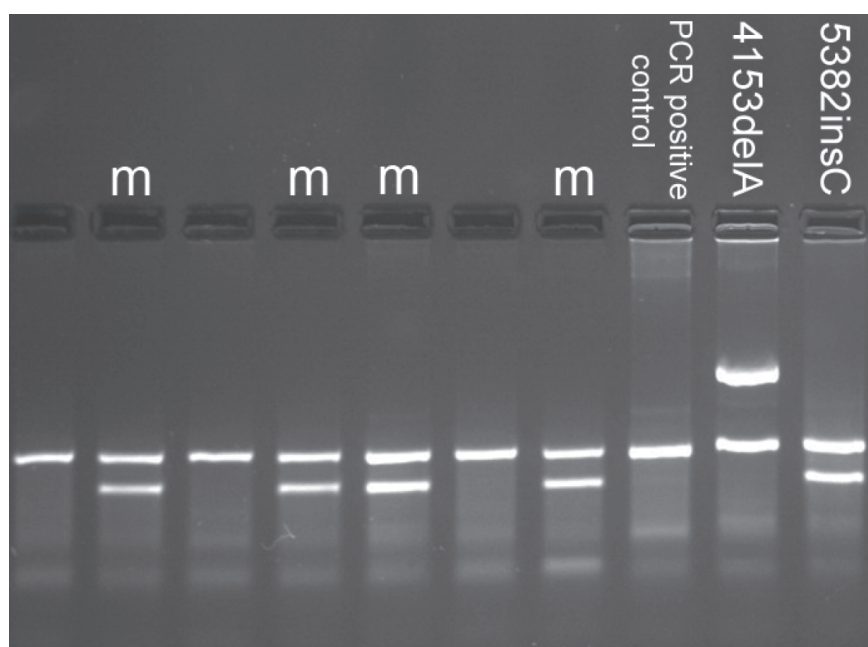
W przypadku niektórych społeczności przy przeprowadzaniu badań w kierunku obecności mutacji *BRCA* można uniknąć skomplikowanego sekwencjonowania DNA. Na przykład u Żydów Aszkenazyjskich tzw. mutacje „założycielskie” (185delAG i 5382insC w *BRCA1* oraz 6174delT w *BRCA2*) odpowiadają za niemal wszystkie defekty *BRCA*. W Islandii nowotwory związane z mutacją *BRCA* związane są z występowaniem allele 999del5 *BRCA2*. W tych i niektórych innych grupach etnicznych prosta detekcja nawracających mutacji, z zastosowaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej specyficznej dla danych alleli lub inna korzystna cenowo technika stanowi alternatywę w pełni uzasadnioną tak merytorycznie, jak i ekonomicznie.

W Polsce mutacje „założycielskie” typu 5382insC (Ekson 20), C61G (Ekson 5) i 4153delA (Ekson 11) odpowiadają za aż 91% wszystkich mutacji genu *BRCA1* [13], a przesiewowe badania chorych w kierunku tych 3 eksonów osiągają czułość na poziomie 86%.

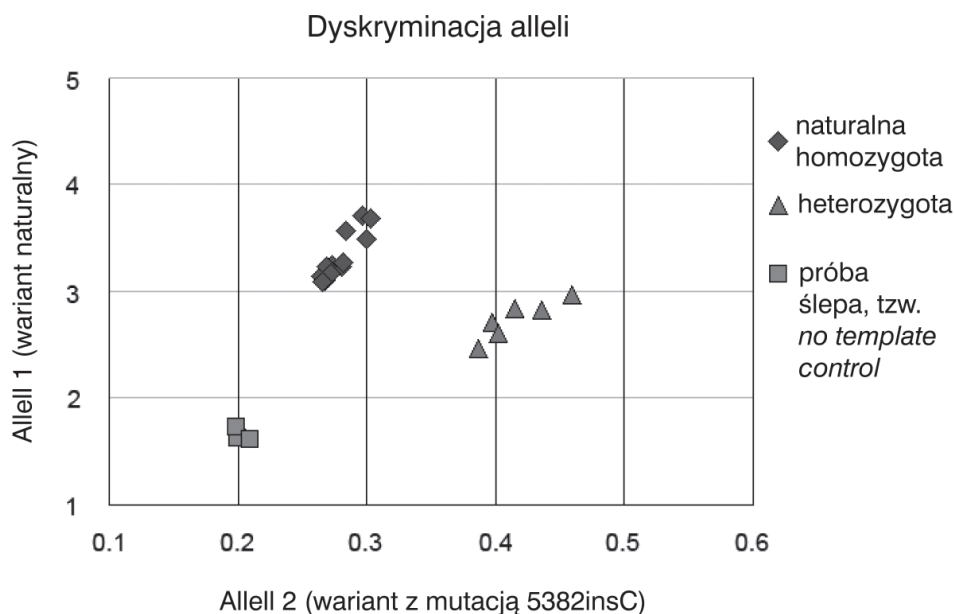
W toku niniejszego badania przeanalizowaliśmy przypadki 316 pacjentów, czy to z nowotworem piersi, czy też z obciążeniami rodzinnymi. W grupie tej mutacje stwierdzono u 26 osób (8,2%) (Tab. I). Częstość występowania mutacji określona w ramach niniejszego badania znacznie przewyższa częstość występowania nosicielstwa mutacji genów *BRCA* w całej populacji [0,13%; 15], ale też chorzy wyselekcjonowani na potrzeby badania wywodzili się z grup o podwyższonym ryzyku zachorowania na raka piersi.

Najczęstszą stwierdzaną mutacją była delecja w eksonie 11 (4153delA). Analiza z zastosowaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej odbywa się dwuetapowo. Najpierw uwidacznia się mutacje w eksonie 11 (4153delA) i eksonie 20 (5382insC), gdzie ekson 5 (C61G), będący próbką dodatnią, wykorzystywany jest jako kontrola polimerazowej reakcji łańcuchowej (Ryc. 1). Drugi etap polega na pobraniu niezmutowanych próbek oraz próbki eksonu 5, traktowanej jako kontrola, w celu trawienia enzymem restrykcyjnym.

Przedstawione przez nas dane potwierdzają zauważalne znaczenie mutacji 5382insC genu *BRCA1* u chorych pochodzących z rejonu Warmii i Mazur, co może stanowić uzasadnienie dla przeprowadzenia rozszerzonego badania w kierunku obecności 5382insC *BRCA1* w tej populacji (Tab. I). W związku z tym opracowaliśmy metodę allelo-specyficznej detekcji 5382insC z zastosowaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej, wykorzystującej sondy TaqMan®. W badaniu tym stosuje się sondy z różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, co pozwala na



Ryc. 1. Zdjęcie żelu agarozowego, przedstawiające produkty PCR umożliwiające identyfikację mutacji 5382insC (m) w genie *BRCA1*. Negatywna kontrola reakcji PCR oraz dodatnia kontrola mutacji (5382insC, 4153delA) zlokalizowane są w prawej części zdjęcia



Ryc. 2. Wynik genotypowania reprezentatywnej subpopulacji ($n=8$) w badaniu zmienności allelicznej z wykorzystaniem fluorescencyjnych sond TaqMan®. Wykres przedstawia próby bez matrycy (NTC, kwadraty) i dwa genotypy: homozygota wobec allelu 1 (romby) oraz heterozygota, tj. nosiciela mutacji (trójkąty)

Tab. I. Częstość występowania mutacji w genie *BRCA1* w badanej grupie pacjentów

Rodzaj mutacji	Liczba pacjentów z wykrytą mutacją
5382insC	5
C61G	9
4153delA	12
Ogółem	26 (8,2% badanej grupy)

odróżnienie mutacji 5382insC *BRCA1* od naturalnego genotypu. Biorąc pod uwagę różnicę około 8 cykli, przy wzmocnieniu sygnału fluorescencyjnego sondy dla mutanta 5382insC-MU w trakcie amplifikacji Real-Time PCR, łatwo było odróżnić pacjentów, czy to homozygotycznych dla allelu naturalnego genotypu ($n=5$), czy też heterozygotycznych, czyli nosicieli mutacji 5382insC ($n=3$). Dwuwariantowe wykresy punktowe wykazały jednoznaczne zagęszczenia próbek i pozwoliły na rozpoznanie mutacji 5382insC (Ryc. 2).

Wnioski

Podsumowując, w toku niniejszego badania potwierdziliśmy znaczną częstość występowania mutacji 5382insC, C61G i 4153delA genu *BRCA1* u chorych pochodzących z rejonu Warmii i Mazur. Uważamy, że przesiewowe badania z wykorzystaniem Real Time PCR w kierunku obecności mutacji najczęściej występujących w danej populacji stanowią skuteczną linię prowadzenia badań.

Mgr Jarosław Turek
e-mail: jaroslaw.turek@uwm.edu.pl

Piśmiennictwo

- Ministerstwo Zdrowia. *Sprawozdanie z realizacji Narodowego Programu Zwalczenia Chorób Nowotworowych w roku 2006*. Warszawa, Polska, 2007, p.18. (<http://www.mz.gov.pl>).
- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-63.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-99.
- Gudas JM, Li T, Nguyen H i wsp. Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 717-23.
- Wang SC, Lin SH, Su LK i wsp. Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 247-51.
- Wilson CA, Payton MN, Elliott GS i wsp. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene* 1997; 14: 1-16.
- Bertwistle D, Swift S, Marston NJ i wsp. Nuclear location and cell cycle regulation of the BRCA2 protein. *Cancer Res* 1997; 57: 5485-8.
- Scully R, Chen J, Plug A i wsp. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88: 265-75.
- Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U i wsp. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 1997; 386: 804-10.
- Monteiro AN, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13595-9.
- Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L i wsp. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 1997; 386: 772-3.
- Lubiński i wsp. *Nowotwory dziedziczne*. Pomeranian Medical University of Szczecin, Poland; 2002.
- Górski B, Jakubowska A, Huzarski T i wsp. A high proportion of founder BRCA1 mutations in polish breast cancer families. *Int J Cancer* 2004; 110: 683-6.
- Byrski T, Huzarski T, Dent R i wsp. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (Article in Press) DOI: 10.1007/s10549-008-0128-9.
- Judson PL, Van Le L. Familial breast and ovarian cancer: the role of the BRCA genes. *Primary Care Update for OB/GYNs* 1998; 5: 140-43.

Otrzymano: 21 listopada 2008 r.
Przyjęto do druku: 15 kwietnia 2009 r.