

## ANALÝZA MUTACE [657DEL(5)] V EXONU 6 GENU NBS-1 U 472 PACIENTEK SE SPORADICKÝM KARCINOMEM PRSU V ČESKÉ REPUBLICE.

## THE ANALYSIS OF NBS-1 GENE MUTATION [657DEL(5)] IN EXON 6 IN THE POPULATION OF 472 SPORADIC BREAST CANCER PATIENTS IN THE CZECH REPUBLIC.

MELTER J.<sup>1</sup>, PAZDROVÁ G.<sup>2</sup>, JANKŮ F.<sup>2,3</sup>, KLEIBL Z.<sup>4</sup>, NOVOTNÝ J.<sup>2</sup>, PETRUŽELKA L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ŠROBÁROV INSTITUT PRO DĚTSKÉ OCHORENIA PLÚC, DOLNÝ SMOKOVEC, SR

<sup>2</sup> ONKOLOGICKÁ KLINIKA I.LF UK A VFN V PRAZE, ČR

<sup>3</sup> BON SECOURS HOSPITAL CORK, IRSKÁ REPUBLIKA

<sup>4</sup> ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE I.LF UK V PRAZE, ČR

### Souhrn

**Východiska:** Nijmegen breakage syndrom (NBS) je způsoben mutací [657del(5)] v exonu 6 genu NBS-1. Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění projevující se mikrocefalií, imunodeficitem, radiosensitivitou a predispozicí k malignitám lymfatických tkání. Nedávno byla v několika studiích potvrzena vysoká incidence mutací NBS-1 v různých slovanských populacích. Jelikož u heterozygotů pro NBS-1 nelze vyloučit vyšší incidenci nádorů, je také nutné objasnit úlohu mutace NBS-1 v karcinogenezi karcinomem prsu. **Metody:** Celkem bylo vyšetřeno na přítomnost mutace NBS-1 472 pacientek se sporadickým karcinomem prsu léčených na Onkologické klinice I.LF UK v Praze. DNA byla extrahována z monocytů v periferní krvi. Následně byly provedeny 2 PCR reakce pro každý vzorek. Vizualizace byla provedena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Jako pozitivní byly hodnoceny vzorky s přítomností specifického bandu pro NBS-1 gen a přítomností bandu pro vnitřní kontrolu. Vzorky, kde byla pozitivní pouze vnitřní kontrola byly hodnoceny jako negativní. U vzorků, kde nebyl zastižen band ani ve vnitřní kontrole, byla reakce opakována. Vzorky DNA získané od dříve pozitivně testovaných jedinců bylo použito jako pozitivní kontrola. **Výsledky:** Ve studované populaci 472 pacientek se sporadickým karcinomem prsu nebyla nalezena žádná mutace [657del(5)] v exonu 6. **Závěr:** Na základě této analýzy nelze považovat mutaci [657del(5)] v exonu 6 za mutaci zvyšující riziko karcinomem prsu.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, NBS-1, mutace, rizikový faktor

### Summary

**Background:** Nijmegen breakage syndrome (NBS) caused by mutation [657del(5)] in exon 6 of NBS-1 is an autosomal recessive disorder with microcephaly, immunodeficiency, radiosensitivity, and predisposition to lymphoid malignancies. Recently, high frequency of this NBS-1 mutation was found in some Slavic populations. Because NBS-1 heterozygotes may have high incidence of neoplastic changes, there is an urgent need to clarify the role of NBS-1 mutation in breast cancer carcinogenesis. **Methods:** We analyzed the NBS-1 mutation [657del(5)] in exon 6 in 472 sporadic breast cancer patients treated in the Department of Oncology, Charles University Prague. DNA was extracted from peripheral blood monocytes. Subsequently two PCRs for each sample were carried out. Reaction was visualized using electrophoresis on agarose gel. Agarose gel wells with both the NBS-1 gene-specific band and internal control band were interpreted as positive. Wells with internal control only were interpreted as negative. PCR from samples giving neither an internal control band nor specific band were repeated. DNA samples obtained from a previously typed NBS family were used as a positive control. **Results:** Based on previously published data we expect to find at least 5 mutation carriers. Surprisingly, in our population of 472 subjects there was no mutation identified. **Conclusion:** Based on results of this study there is no relationship between NBS-1 mutation and breast cancer incidence.

**Key words:** Breast cancer, mutation, NBS-1, risk factor

### ÚVOD

Nijmegen breakage syndrom (NBS) je vzácným dědičným autosomálně recesivním onemocněním, jehož podstatou je porucha opravných mechanismů DNA. Klinicky se projevuje mikrocefalií, růstovou retardací, imunodeficitem, hypersenzi-

tivitou k záření X a zvýšenou incidencí k lymfoidním malignitám (1). Mutace v genu NBS-1 vede k poruše syntézy proteinu zvaného fibrin, který je důležitý pro opravu dvojitých zlomů DNA (2, 3). Nedávno bylo publikováno několik původních článků, které zmiňují vyšší než očekávanou incidenci

[675del(5)] mutace genu NBS-1 u různých slovanských národů. Jednalo se o populaci žijící v České republice, Polsku a na Ukrajině (4, 5, 6). V souvislosti s mutací NBS-1 byla některými autory u heterozygotů popsána vyšší incidence nádorů (6). Vzhledem k pravděpodobně vyššímu výskytu heterozygotů pro mutaci NBS-1 je nutné plně objasnit dopad mutace na incidenci nádorových onemocnění. Náš výzkum se zabýval karcinomem prsu, který je nejčastějším nádorovým onemocněním dospělých žen (7).

## METODY

Celkem bylo zařazeno 472 pacientek Onkologické kliniky 1.LF UK a VFN v Praze s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu. Nábor probíhal v letech 2003 – 2005. Do populační studie byly zařazeny všechny ženy, které nesplňovaly kritéria pro mutační analýzu genů *BRCA1* a *BRCA2*, a to bez ohledu na věk v době diagnózy či stádium v době diagnózy či v době odběru. Pacientkám byla odebrána zkumavka nesrážlivé krve k následné izolaci DNA a mutační analýze.

DNA byla extrahována z mononukleárních buněk periferní krve s využitím kitů firmy Qiagen.

Amplifikace vysokomolekulární DNA proběhla s využitím GoTaq polymerázy (Promega), dNTP<sup>s</sup> o koncentraci 0,2 mM každý (Promega) a primerů, jejichž design je uveden v **tabulce č. 1**. Podmínky PCR reakce jsou shrnuty v **tabulce č. 2**. Vizualizace a separace produktů amplifikační reakce byla prováděna v 2% agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromid. Do každého běhu elektroforézy byla zařazena pozitivní kontrola specifická pro mutaci v NBS-1 genu (271 bp) a kontrola negativní.

Výzkum probíhal ve shodě s Helsinskou deklarací a byl schválen místní etickou komisí. Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu.

## VÝSLEDKY

V našem souboru 472 pacientek se sporadickým karcinomem prsu jsme pomocí NBS-1 specifických primerů nezjistili ani jednu mutaci. Výsledek je v rozporu s očekáváním. Na základě literárních dat byl očekáván výskyt mutací alespoň u 5 pacientek. Jeden z výsledků po vizualizaci pomocí elektroforézy je na **obrázku č. 1**.

## DISKUSE

V naší studii jsme použili metodiku PCR-SSP na detekci mutace nibrinu [657del(5)] dříve publikovanou Drábekem a spol. (5). Ve srovnání s dříve publikovanými pracemi se single-strand conformation polymorphism se u SSP dá očekávat vyšší senzitivita (8).

**Tabulka č.1.:** Sekvence jednotlivých primerů použitých při detekci NBS-1 [657del(5)].

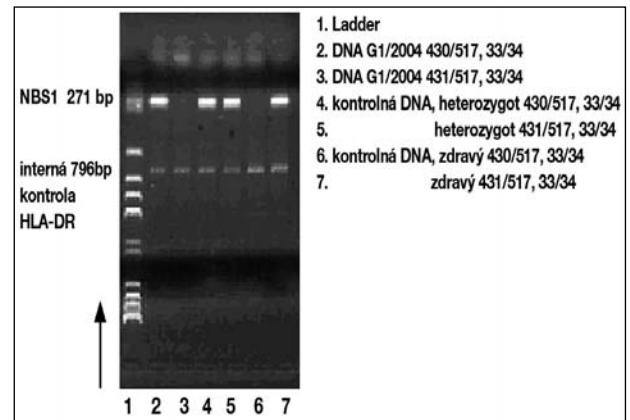
430NBS1ex6	5'-	ACGGCAGGAAAGAAATCTTC	&#8211; 3? (final conc. 0,6uM)
431NBS1ex6	5'-	CGGCAGGAAAGAAAACAAAT	&#8211; 3? (final conc. 0,6uM)
517NBS1ex6	5'-	ATGAATAGGCCAGTTATCACAG	&#8211; 3? (final conc. 0,6uM)
33DRBex3	5'-	TGCCAAGTGAGCACCCAA	&#8211; 3? (final conc. 0,6uM)
34DRBex4	5'-	GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	&#8211; 3? (final conc. 0,6uM)

**Tabulka č. 2.:** Schéma amplifikační reakce.

Úvodní denaturace:		96°C/1 min.
A:	5x	(denaturace 96°C/35 s., annealing 55°C/45 s., extenze 72°C/35 s.)
B:	21x	(denaturace 96°C/25 s., annealing 55°C/50 s., extenze 72°C/40 s.)
C:	6x	(denaturace 96°C/35 s., annealing 55°C/60 s., extenze 72°C/90 s.)
Závěrečná extenze:		72°C/5 min.

U heterozygotních nosičů mutace NBS-1 [657del(5)] se předpokládá vyšší riziko vzniku nádorového bujení vzhledem k poruše opravných mechanismů. Očekává se i vyšší citlivost k radioterapii (9). Doposud několik skupin nezávisle na sobě publikovalo vyšší četnost mutace NBS-1 [657del(5)] v zemích střední a východní Evropy. Varon a spol. (4) udává četnost mutace v české populaci 1:154 a 1:190 v polské populaci, Drábek a spol. (5) dokonce 1:95 v populaci 383 zdravých jedinců. Steffen a spol. (6) vyšetřil na přítomnost mutace 1683 pacientů s různými typy nádorů. Mezi největší skupiny patřilo 105 pacientů s maligním melaninem, 234 pacientů s koloektální karcinomem a 224 pacientek s karcinomem prsu. Četnost mutace činila u maligního melanomu 1:26 (šestinásobek očekávané hodnoty), u kolorektálního karcinomu 1:78 (dvojnásobek očekávané hodnoty) a u karcinomu prsu 1:56 (trojnásobek očekávané hodnoty). Celkem byla četnost výskytu mutace 1:105. Cílem naší studie bylo potvrdit vysokou četnost mutace u sporadického karcinomu prsu, a tak nepřímou potvrdit její možný podíl na karcinogenezi tohoto nádoru. Překvapivě jsme v našem souboru 472 pacientek, který je svou velikostí víc jak dvojnásobný než podskupina ve studii Steffena (6), nezjistily ani jednu mutaci. Četnost je tedy nižší než 1:472, což je výrazně méně i ve srovnání se zdravou populací zemí střední a východní Evropy.

Vzhledem k tomu, že velikost našeho souboru je dostatečná, lze s poměrně značnou mírou jistoty zpochybnit význam mutace NBS-1 [657del(5)] pro karcinogenezi sporadického karcinomu prsu.



**Obrázek č. 1:** Elektroforéza produktů PCR reakce demonstruje oba nálezy: fyziologickou alelu i alelu mutovanou - podrobnější vysvětlení viz. obrázek.

## PODĚKOVÁNÍ

Výzkum byl podpořen grantem RASO ČOS ČLS JEP a výzkumným záměry MSM0021620808.

## LITERATURA

1. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. Arch Dis Child 2000; 82: 400-406
2. Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, et al. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. Nat Genet. 1998; 19: 179-181
3. Carney JP, Maser RS, Olivares H, et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell. 1998; 93: 477-486
4. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K, et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. Eur J Hum Genet 2000; 8: 900-902
5. Drabek J, Hajduch M, Gojova L, et al. Frequency of 657del(5) mutation of the NBS1 gene in the Czech population by polymerase chain reaction with sequence specific primers. Cancer Genet Cytogenet. 2002; 138: 157-159
6. Steffen J, Varon R, Mosor M, et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. Int J Cancer 2004; 111: 67-71
7. Anonymus. Novotvary 2001 ČR. Praha, UZIS CR, NOR CR: 2004, 57-65
8. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, et al. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. Electrophoresis. 1999; 20: 1177-1185
9. Seemanova E. An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. Mutat Res. 1990; 238: 321-324

Došlo: 27. 3. 2006  
Přijato: 26. 4. 2006

Nemáme vzdělání, ale nekouříme!

**síla přirozené inteligence**

PSI ČESKÝCH ONKOLOGŮ VARUJÍ: KOUŘENÍ ZPŮSOBUJE RAKOVINU