

Analisi dei geni RAS nelle neoplasie mammarie del cane mediante la tecnica PCR-SSCP e il sequenziamento genomico diretto

Massimo CASTAGNARO

*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi, Torino*

Riassunto. - Le capacità oncogene dei geni della famiglia RAS (*Ha-ras*, *Ki-ras*, and *N-ras*) vengono generalmente attivate da mutazioni puntiformi in regioni conservate (codoni 12, 13 e 61) a cui conseguono sostituzioni di singoli aminoacidi nella specifica proteina (p21). Allo scopo di verificare il coinvolgimento dei geni della famiglia RAS nell'insorgenza delle neoplasie mammarie del cane abbiamo analizzato il DNA genomico di 20 tumori mammari di cane con l'utilizzo del metodo Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) e del sequenziamento genomico diretto. L'assenza di mutazioni puntiformi negli "hot spot" dei geni RAS suggerisce la mancanza o una bassa frequenza di questo meccanismo di attivazione nei tumori mammari del cane. I risultati sono sovrapponibili a quanto descritto nelle neoplasie mammarie umane. Tuttavia, la presenza di alterazioni genetiche in aree funzionali diverse o la presenza di altri meccanismi di attivazione dei geni RAS non possono essere escluse.

Parole chiave: geni RAS, neoplasie mammarie, cane.

Summary (*RAS genes analysis in mammary tumors of the dog by means of PCR-SSCP and direct genomic sequencing*). - The oncogenic capacities of RAS family genes (*Ha-ras*, *Ki-ras*, and *N-ras*) are usually activated by point mutations in the conserved regions (codons 12, 13, and 61), resulting in single amino acid substitution in the specific proteins (p21). In order to verify the involvement of RAS genes in dog mammary tumors we analyzed the genomic DNA from 20 mammary tumors of dog by means of the Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) method and the direct genomic sequencing. The absence of point mutations in the "hot spots" of RAS genes suggests a lack or a low frequency of such a pattern of RAS genes activation in dog mammary tumors. The results are also in agreement to what reported in human mammary tumors. However, the presence of genetic alterations in other functional areas of the RAS genes or other mechanisms of activations cannot be ruled out.

Key words: RAS genes, mammary tumors, dog.

Introduzione

Nella maggior parte dei mammiferi la famiglia RAS comprende tre geni funzionali: il c-Harvey (*Ha-ras-1*), il c-Kirsten (*Ki-ras-2*) ed il c-Neuroblastoma (*N-ras*) [1]. Tutti e tre i geni sono organizzati in 4 esoni e codificano per un prodotto proteico da 188 a 189 aminoacidi (p21), che si ritiene giochi un ruolo importante nella crescita e nella differenziazione cellulare [2-4]. Sebbene le tre p21 producano tutte il loro effetto attraverso il legame con il GDP ed il GTP, recenti studi suggeriscono che ognuna di esse possiede proprietà biochimiche specifiche [5]. Inoltre, i geni RAS dimostrano diversità caratteristiche nell'attività della regione promoter [6].

Le capacità oncogene dei geni RAS vengono comunemente attivate da mutazioni puntiformi ai codoni 12, 13 e 61 ("hot spot") a cui conseguono specifiche

sostituzioni di aminoacidi nella proteina p21 da loro codificata. Queste mutazioni sono state descritte in un ampio spettro di tumori umani ed animali e nelle rispettive linee cellulari di derivazione [7-11]. Nelle neoplasie coloretali, le mutazioni al gene *Ki-ras* vengono ritenute importanti nello sviluppo e nella progressione neoplastica [12]. Nel cane, attivazioni del gene *Ki-ras* sono state segnalate nei tumori polmonari diversi dal microcitoma [13].

Allo scopo di valutare la presenza di mutazioni puntiformi negli "hot spot" dei geni RAS nei tumori mammari del cane, abbiamo analizzato il DNA genomico estratto da neoplasie mammarie di cane rimosse chirurgicamente, con la tecnica Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) e con il sequenziamento genomico diretto.

Materiali e metodi

Campioni di DNA

Campioni di tessuto appartenenti a 23 tumori mammari di cane rimossi chirurgicamente (Tab. 1) venivano congelati, tagliati ad uno spessore di 10 μm e colorati con ematossilina ed eosina. Dopo valutazione istopatologica (Tab. 1) secondo la classificazione WHO [14], i blocchetti congelati venivano ulteriormente ridotti allo scopo di rimuovere la parte di tessuto non-neoplastica e di arricchire quindi la proporzione di cellule tumorali nel campione. Il DNA ad alto peso molecolare veniva poi estratto secondo i protocolli standard [15].

Tabella 1. - Classificazione dei tumori mammari canini compresi nello studio

Numero campione	Classificazione	Numero casi
1	Adenoma semplice	1
2-3	Papilloma duttale	2
4	Fibroadenoma intracanicolare	1
5-10	Adenoma complesso	5
11-13	Tumore misto benigno	3
14-16	Adenocarcinoma tubolare complesso	3
17-18	Adenocarcinoma papillare complesso	2
19-21	Carcinoma solido semplice	3
22	Carcinoma fusocellulare	1
23	Carcinoma a cellule squamose	1

Come controllo negativo veniva utilizzato il DNA estratto da campioni di sangue prelevati da 5 cani. Come controlli positivi e negativi per la sensibilità delle tecniche utilizzate, venivano compresi nello studio tre campioni di DNA (A-C) appartenenti a carcinomi coloretali umani con mutazioni al gene *Ki-ras* già caratterizzate e DNA ottenuto da 3 linee cellulari umane (E-F) senza mutazioni al gene *Ki-ras*.

Analisi PCR-SSCP

La sequenza di ogni coppia di primer utilizzata per amplificare gli esoni 1 e 2 dei geni *Ha-ras*, *Ki-ras* ed *N-ras* veniva ottenuta dai dati in letteratura [16-18] (Tab. 2).

La miscela di amplificazione (50 μl) utilizzata per amplificare il DNA genomico (50 nm) era così composta: 20 μM dATP, dGTP, dTTP; 2 μM dCTP; da 1,0 a 2,5 mM MgCl₂; 20 pmol di ogni primer; 20 mM Tris (pH 8,4 o 8,6); 50 mM KCl; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ albumina di siero bovino; 0,5 unità di Taq polimerasi (Perkin-Elmer Cetus); 0,1 μl (7 nm) [α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol). L'amplificazione consisteva in 30 cicli termici (30 s a 94 °C, 90 s a 50-60 °C, e 120 s a 71 °C) portati a termine su un "thermal cycler controller" (Perkin-Elmer Cetus). Per verificare la corretta grandezza dei frammenti generati veniva poi eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. Un decimo del prodotto amplificato veniva in seguito diluito in 15-40 μl di una soluzione di sodio dodecil- solfato (0,1%) - EDTA (10mM), acido bórico (89 mM), bromofenolo blu (0,05%) e xylene cyanol (0,05%). I campioni diluiti erano poi caricati su gel di poliacrilamide non-denaturanti al 6% con o senza glicerolo 10%.

Tabella 2. - Sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per amplificare gli esoni 1 e 2 dei geni RAS

Geni RAS	Esone	Sequenza nucleotidica	Senso/antisenso
<i>N-ras</i>	1	5'-GACTGAGTACAACTGGTGG	senso
		5'-CACTATGGTGGGATCATATT	antisenso
<i>N-ras</i>	2	5'-GGTCAAACCTGTTTGTGGGA	senso
		5'-ATACACAGAGGAAGCCTTCG	antisenso
<i>Ki-ras</i>	1	5'-CATGTTCTAATATAGTCACA	senso
		5'-AACAAGATTACCTCTATTG	antisenso
<i>Ki-ras</i>	2	5'-TTCCTACAGGAAGCAAGTAG	senso
		5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCA	antisenso
<i>Ha-ras</i>	1	5'-CTGAGGAGCGATGACGGAAT	senso
		5'-AGTGGGGTCGTATTCTGCCA	antisenso
<i>Ha-ras</i>	2	5'-GTCATTGATGGGGAGACGTG	senso
		5'-ACACACACAGGAAGCCCTCC	antisenso

Sequenziamento genomico diretto

Allo scopo di evidenziare e caratterizzare la sequenza nucleotidica degli alleli mutanti, veniva effettuato il sequenziamento genomico diretto secondo quanto descritto da Yandell e Dryja [19]. Il sequenziamento veniva eseguito sia in direzione senso che antisenso in reazioni separate. I frammenti amplificati con PCR erano purificati con Sepharose CL-6B (Pharmacia) e combinati con un primer (7 pmol) 32P-end-labeled. La miscela primer-DNA veniva poi denaturata e la reazione di sequenziamento eseguita con Sequenase 2,0 (US Biochemical) a 37 °C. I campioni erano infine caricati su gel di poliacrilamide denaturante al 6%. In tutti i casi positivi all'analisi SSCP la reazione di sequenziamento veniva ripetuta 2 volte.

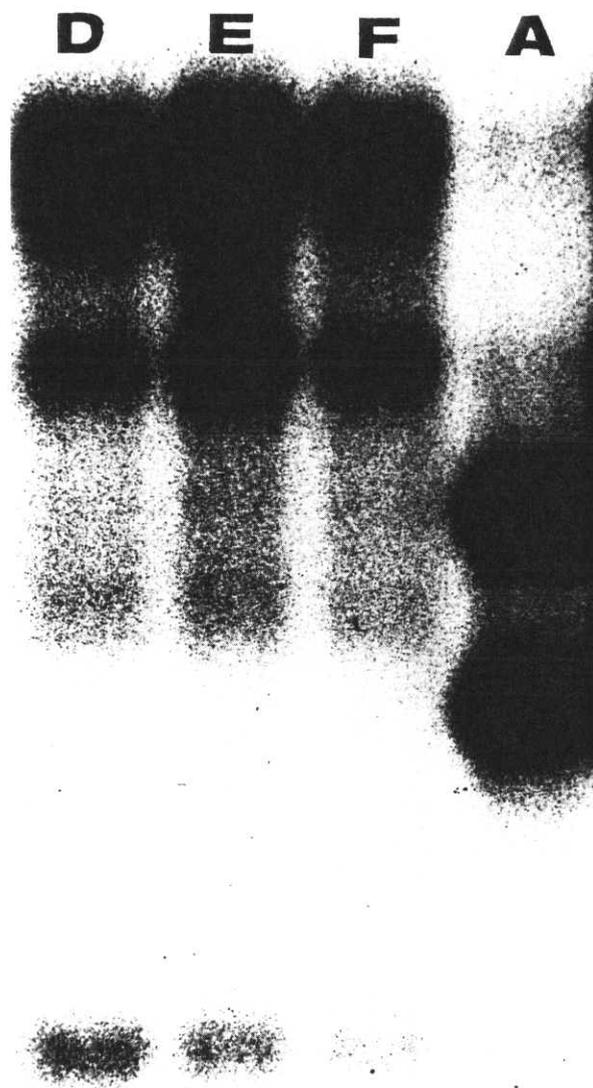


Fig. 1. - Analisi SSCP su gel di poliacrilamide non denaturante, esone 1 del gene *Ki-ras*. All'analisi elettroforetica appare una chiara variazione migratoria nel campione A rispetto a tre campioni di DNA umano normale (E-F).

Risultati

La grandezza dei frammenti di DNA umano e canino amplificato accertata su gel di agarosio era identica e così caratterizzata: esone 1 *N-ras*, 110 bp; esone 2 *N-ras*, 103 bp; esone 1 *Ki-ras*, 177 bp; esone 2 *Ki-ras*, 128 bp; esone 3 *Ha-ras*, 115 bp; esone 4 *Ha-ras*, 112 bp. L'avvenuta amplificazione dei frammenti di DNA indicava l'assenza di alterazioni genomiche rilevanti.

All'analisi SSCP, tutti i campioni di carcinoma colorettrali umani presentavano pattern di migrazione anomali nei frammenti dell'esone 1 del gene *Ki-ras*, confermati da una seconda analisi indipendente (Fig. 1). Il sequenziamento genomico diretto dimostrava che tutte le mutazioni puntiformi erano presenti nel codone 12 (sostituzione G>A, GGT>GAT in tutti i campioni).

Sebbene l'analisi SSCP rivelasse una chiara differenza nel pattern di migrazione tra i campioni umani e quelli canini (con l'eccezione dell'esone 1 del gene *N-ras*) (Fig. 2), non venivano osservate varianti SSCP nei 23 campioni



Fig. 2. - Analisi SSCP su gel di poliacrilamide non denaturante, esone 1 del gene *Ha-ras*. Nel gel si possono osservare differenze migratorie tra il DNA umano (E-F) e quello canino (14, 17, 19).

di DNA canino. Il sequenziamento genomico diretto degli esoni 1 e 2 dei geni *N-ras*, *Ki-ras* e *Ha-ras* di cinque campioni scelti a caso (numeri 19-23) e dei campioni controllo metteva in evidenza una sequenza "wild type" senza mutazioni puntiformi agli "hot spot". La sequenza osservata risultava conforme a quanto riportato in letteratura [13, 17, 18].

Discussione

Nel nostro studio non è stato possibile evidenziare nessun tipo di mutazione puntiforme agli "hot spot" (codoni 12, 13 e 61) dei geni *N-ras*, *Ki-ras* e *Ha-ras* in 23 tumori mammari di cane. I motivi della non dimostrazione di mutazioni puntiformi possono essere dovuti a molti fattori quali la sensibilità della tecnica di screening utilizzata (SSCP) e/o la bassa percentuale di cellule neoplastiche portatrici di una particolare mutazione. In uno studio recente, è stata valutata l'efficienza dell'analisi SSCP, per frammenti di 100-200 bp, attorno al 98% [20]. Inoltre studi con tecniche di microdissezione eseguiti in laboratori differenti e su diversi tumori, hanno dimostrato che l'analisi SSCP è in grado di evidenziare mutazioni puntiformi presenti nel 10-20% della popolazione neoplastica (C. Poremba, comunicazione personale).

Tutte queste considerazioni indicano che, se presenti, le mutazioni puntiformi ai geni RAS nei tumori mammari del cane rappresentano un evento non frequente.

Questi dati concordano inoltre con quanto descritto nelle neoplasie mammarie umane dove, sebbene siano ben riportati aumenti dei livelli di RNA codificato dai geni RAS [21, 22], le mutazioni puntiformi agli "hot spot" sono state dimostrate solamente in linee cellulari ed in forme rare di carcinosarcoma [23].

In conclusione, i risultati da noi riportati suggeriscono che se l'attivazione dei geni RAS è presente nei tumori mammari del cane, possono entrare in gioco altri meccanismi di attivazione.

Ricevuto il 13 giugno 1994.

Accettato il 26 ottobre 1994.

BIBLIOGRAFIA

1. BARBACID, M. 1987. RAS genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 779-827.
2. KONKEL, D.A. 1988. What do RAS oncogenes do? *Mol. Endocrinol.* **2**: 883-885.
3. LU, Y., ANDERSON, S., CORBLEY, M.J., ZHOU, Y.C., PROSS, H. & HALIOTIS, T. 1992. RAS modulates commitment and maturation of 10t1/2 fibroblasts to adipocytes. *Biochem. Cell Biol.* **70**: 1249-1257.
4. CELANO, P., BERCHTOLD, C.M., MABRY, M., CARROLL, M., SINDRASKY, D., CASERO, R.A. & LUPU, R. 1993. Induction of markers of normal differentiation in human colon carcinoma cells by the *v-ras(H)* oncogene. *Cell Growth Differ.* **4**: 341-347.
5. CARBONE, A., GUSELLA, G.I., RADZIOCH, D. & VARESI, L. 1991. Human Harvey-*ras* is biochemically different from Kirsten-*ras* or *N-ras*. *Oncogene* **6**: 731-737.
6. THORN, J.T., TODD, A.V., WARRILOW, D., WATT, F., MOLLOY, P.L. & ILAND, H.J. 1991. Characterization of the human *N-ras* promoter region. *Oncogene* **6**: 1843-1850.
7. CHANG, E.H., FURTH, M.E., SCOLNICK, E.M. & LOWY, D.R. 1982. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* **297**: 479-483.
8. CAPON, D.J., CHEN, E.Y., LEVISON, A.D., SEEBURG, P.H. & GOEDDEL, D.V. 1983. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* **302**: 33-37.
9. EVA, A., TRONICK, S.R., GOL, R.A., PIERCE, J.H. & AARONSON, S.A. 1983. Transforming genes of human hematopoietic tumors: frequent detection of RAS related oncogene whose activation appears to be independent of tumor phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4926-4930.
10. FARR, C.J., SAIKI, R.K. & ERLICH, H.A. 1988. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1629-1633.
11. HALL, A., MARSHALL, J., SPURR, N.K. & WEISS, R.A. 1983. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell line as a new member of the RAS gene family located on chromosome 1. *Nature* **303**: 396-400.
12. FEARON, E.R. & JONES, P.A. 1992. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J.* **6**: 2783-2790.
13. KRAEGEL, S.A., GUMERLOCK, P.H., DUNGWORTH, D.L., OREFFO, V.I.C. & MADEWELL, R. 1992. K-*ras* activation in non-small cell lung cancer in the dog. *Cancer Res.* **52**: 4724-4727.
14. HAMPE, J.F. & MISDORP, W. 1974. Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bull. WHO* **50**: 111-133.
15. MANIATIS, T., FRITSCH, J. & SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 2 (par. 9.14-9.23). Cold Spring Harbor, New York.
16. MADEWELL, B.R., GUMERLOCK, P.H., SAUNDERS, K.A., MEYERS, F.J., KRAEGEL, S.A. & KAWASAKI, S. 1989. Canine and bovine RAS family expression detected and discriminated by use of polymerase chain reaction. *Anticancer Res.* **9**: 1743-1750.
17. SAUNDERS, K.A., MADEWELL, B.R., OREFFO, V.I.C., KRAEGEL, S.A. & GUMERLOCK, P.H. 1992. Nucleotide sequence of canine c-*N-ras*: codons 1 to 71. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 600-603.
18. CASTAGNARO, M., POREMBA, C. & YANDELL, D.W. 1993. Analisi molecolare dei proto-oncogeni K-*ras*, N-*ras* e Ha-*ras* nei tumori mammari del cane. In: *Atti XLVII Congresso della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Riccione, 28-30 settembre 1993. Grafiche Scuderi, Messina.
19. YANDELL, D.W. & DRYJA, T.P. 1989. Detection of DNA sequence polymorphism by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* **45**: 547-555.

20. HAYASHI, K. & YANDELL, D.W. 1994. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mutation*. (in stampa).
21. THOR, A., OHUCHI, N., HORAN HAND, P., CALLAHAN, R., WEEKS, M.O., THEILLET, C., LINDEREAU, R., ESCOT, C., PAGE, D.L., VILASI, V. & SCHOLM, J. 1986. RAS gene alterations and enhanced levels of RASp21 expression in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Lab. Invest.* **55**: 603-615.
22. SPANDIDOS, D.A. & AGNATIS, N.J. 1984. Human malignant tumors of the breast, as compared to their respective normal tissue, have elevated expression of the Harvey-*ras* oncogene. *Anticancer Res.* **4**: 269-275.
23. KRAUS, M.H., YUASA, Y. & AARONSON S.A. 1984. A position 12-activated H-*ras* oncogene in all HS 578T mammary carcinoma cells but not normal mammary cells of the same patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5384-5388.