

Apoptoza i mutacje w genie BRCA1 u kobiet z rakiem piersi z regionu łódzkiego

Apoptosis and BRCA1 gene mutations in women with breast cancer from the Lodz region of Poland

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Marek Zadrożny², Tomasz Stetkiewicz³, Tomasz Pertyński³, Andrzej Kulig¹

Cel: Gen BRCA1 koduje białko wielofunkcyjne, które wpływa na integralność genomu poprzez swoją rolę w regulacji mechanizmów naprawy DNA oraz regulację procesu apoptozy. Apoptotyczna śmierć komórek ma istotne znaczenie w patogenezie i progresji nowotworów, a także w odpowiedzi na leczenie. Celem badań było określenie częstości mutacji w genie BRCA1 oraz apoptozy u kobiet z rakiem piersi.

Materiały i metody: Krew do badań została uzyskana od 40 kobiet z rakiem piersi. Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od osób (n=42), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej. Mutacje w genie BRCA1 zostały określone przy zastosowaniu techniki PCR-RFLP. Apoptoza była wykrywana przy pomocy elektroforezy w żelu agarozowym.

Wyniki: Uszkodzenia apoptotyczne zostały wykryte u 30% (12/40) pacjentek. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości apoptozy pomiędzy grupą badaną a kontrolną ($P>0,05$). Stwierdzono jedną mutację Ex20insC w genie BRCA1 w grupie badanej.

Wnioski: Obecność apoptozy w komórkach limfocytów krwi obwodowej u chorych na raka piersi sugeruje potencjalną rolę tego procesu w rozwoju raka piersi. Brak mutacji w genie BRCA1 w większości przypadków wskazuje, że prawdopodobnie istnieją inne, niezidentyfikowane jeszcze geny predysponujące do tej choroby.

Słowa kluczowe: BRCA1, apoptoza, rak piersi, mutacje genowe

(Przegląd Menopauzalny 2005; 3: 53–57)

Wstęp

Mutacje w genach supresorowych BRCA1 (ang. *BR*east-*C*ancer *s*usceptibility *g*ene *1*) i BRCA2 predysponują do rozwoju raka piersi i jajnika [1–4]. Ba-

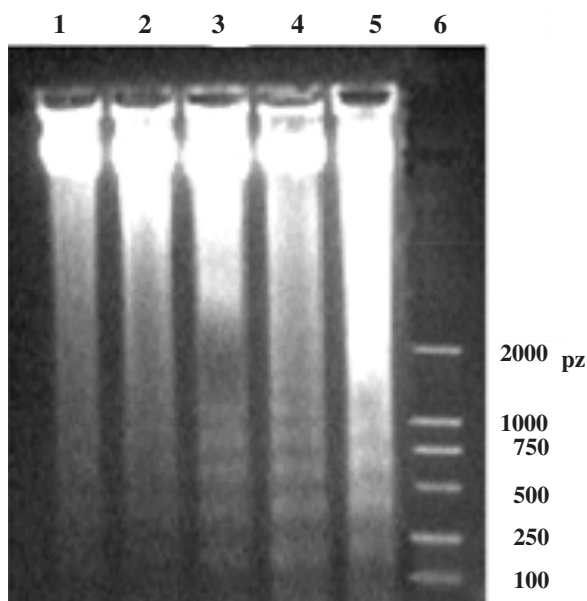
dania wskazują, że białka kodowane przez te geny uczestniczą w ważnych procesach komórkowych. W szczególności oba białka wpływają na naprawę DNA i regulację transkrypcji w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [5, 6]. Białka BRCA1 i BRCA2 są ko-

¹ Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

² Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Piersi Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: dr n. med. Marek Zadrożny

³ Klinika Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński





Ryc 1. Elektroforeza w żelu agarozowym DNA uzyskane-
go z limfocytów krwi obwodowej pobranych od chorych
na raka piersi. Charakterystyczne dla procesu apoptozy
drabinki apoptotyczne są obecne w ścieżkach 3.–5. u cho-
rych na raka piersi. Ścieżka 6. – marker długości par za-
sad (Qiagen, Hilden, Germany)

nieczne dla zachowania stabilności chromosomów, co chroni genom przed uszkodzeniami [7]. BRCA1/2 oddziałują z wieloma innymi białkami uczestniczącymi w naprawie DNA (RAD51, RAD52, XRCC2, PIR54) i procesie apoptozy (Bax, Bcl-2, P53) [8].

Apoptoza jest genetycznie uwarunkowanym procesem fizjologicznym, polegającym na zmianach biochemicznych i morfologicznych komórek, które prowadzą poprzez proteolityczną i nukleolityczną degradację składników komórki do jej śmierci. Obecnie wiadomo, że występowanie i rozwój nowotworu jest wynikiem nie tylko nagromadzenia się w komórkach zmian genetycznych powstałych w konsekwencji nadekspresji lub mutacji protoonkogenów, czy też utraty lub zmian genów supresorowych. Za równie istotny czynnik w tych procesach uważa się obniżenie zdolności komórek do prawidłowego przeprowadzania programu aktywnej śmierci – apoptozy, jako odpowiedzi na bodźce pochodzące z otaczającego środowiska [10]. Apoptoza jest regulowana przez białka z rodziny Bcl-2; supresory apoptozy Bcl-2, Bcl-X_L czy Mcl-1 oraz jej promotory Bax, Bak i Bcl-X_S [11, 12].

W raku piersi defekty w ekspresji mRNA Bax są kluczowym promotorem apoptozy [13]. p53 działa jako transkrypcyjny regulator genu Bax oraz współdziała z BRCA1 [14]. BRCA1 podwyższa zależną od p53

transkrypcję promotorów p21WAF1/CIP1 i bax [15] BRCA1 i p53 oddziałują *in vitro* i *in vivo* i wspólnie indukują apoptozę w komórkach rakowych.

W raku piersi stwierdzono związek pomiędzy apoptozą a stopniem zaawansowania nowotworu i negatywnymi recetorami estrogenowymi. Wysoki poziom apoptozy w raku piersi jest złym czynnikiem rokowniczym [16].

Jednym z przejawów apoptozy jest fragmentacja DNA na poziomie nukleosomów (185 pz). Zazwyczaj pofragmentowany DNA jest wykrywany poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. W niniejszej pracy badano częstość apoptozy przy zastosowaniu powyższej techniki u chorych na raka piersi. Poza tym analizowano mutacje w genie BRCA1, ponieważ uczestniczy on w indukowaniu tego procesu.

Materiał i metody

Pacjentki z rakiem piersi

Krew do badań została uzyskana od 40 kobiet z rakiem piersi, u których stwierdzono obecność (n=12) lub brak przerzutów (n=28) do okolicznych węzłów chłonnych. Krew pobrano od 18 kobiet w wieku przedmenopauzalnym (średnia wieku \pm SD 41,33 \pm 4,72 lat) i od 22 kobiet w wieku pomenopauzalnym (średnia wieku \pm SD 65,33 \pm 7,66 lat). Średni rozmiar guza wynosił 20 mm (17–32 mm). Wszystkie nowotwory były klasyfikowane wg skali Scarffa-Blooma-Richardsona. W badaniach wykorzystano 17 przypadków nowotworów I stopnia, 16 – II stopnia i 7 – III stopnia zaawansowania.

Grupa kontrolna

Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet (n=42), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej.

Analiza apoptozy

Analiza apoptozy została przeprowadzona w DNA uzyskanym z limfocytów krwi obwodowej przy zastosowaniu komercyjnie dostępnego zestawu Ladder Ex™ (TaKaRa BIO INC., Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta (ryc. 1.).

Analiza mutacji BRCA1

Analiza mutacji w genie BRCA1 została przeprowadzona w DNA uzyskanym z limfocytów krwi obwodowej przy zastosowaniu komercyjnie dostępnego zestawu (Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych, Szczecin, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta (ryc. 2.).



Analiza statystyczna

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

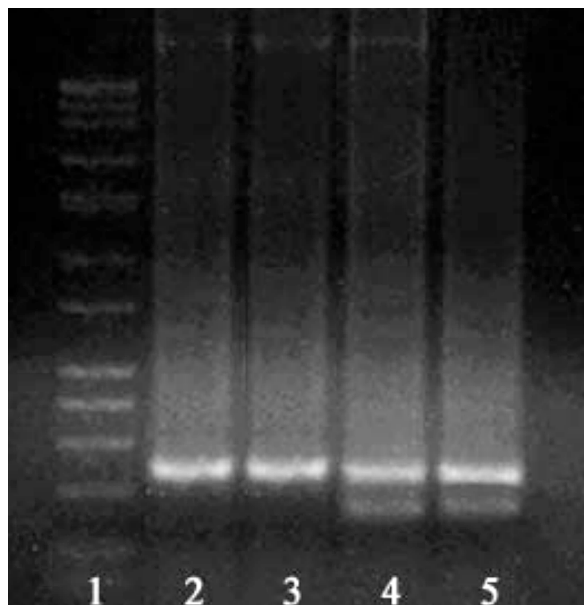
Wyniki

Genomowy DNA był ekstrahowany z 40 próbek krwi uzyskanych od chorych na raka piersi i 42 zdrowych osób. Apoptotyczne uszkodzenia DNA w limfocytach krwi obwodowej zarówno u pacjentów, jak i w kontroli były wykrywane z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarozowym.

Częstość apoptozy u chorych na raka piersi i w kontroli została przedstawiona w tab. I. 12 z 40 próbek rakowych (30%) charakteryzowało się obecnością apoptotycznych uszkodzeń DNA w limfocytach krwi obwodowej. W przypadku kontroli 14 z 42 przypadków (33%) wykazywało fragmentację DNA. Obecność *drabinek apoptotycznych* w komórkach rakowych nie była wyższa niż w komórkach prawidłowych ($P > 0,05$). Wśród apoptotycznie pozytywnych próbek 7 pochodziło od kobiet w wieku przedmenopauzalnym i 5 od kobiet w wieku pomenopauzalnym. Analiza częstości apoptozy pomiędzy tymi grupami wykazała brak statystycznie istotnych różnic (test Mann-Whitney U, $P = 0,051$).

Zależność rozkładu częstości apoptozy od stopnia zaawansowania nowotworu określonego wg skali Scarfa-Blooma-Richardsona dla chorych na raka piersi przedstawia tab. II. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy stopniem apoptozy w podgrupach o różnym stopniu zaawansowania nowotworów ($P < 0,05$).

Analiza mutacji genu BRCA1 została przeprowadzona w grupie chorych na raka piersi. W grupie 40 badanych kobiet stwierdzono tylko jedną mutację Ex20insC BRCA1.



Ryc. 2. Wynik reakcji PCR-RFLP z fragmentami genu BRCA1 analizowany w wyniku elektroforezy w 2% żelu agarozowym po barwieniu bromkiem etydyny i wizualizacji w świetle UV. Ścieżka 1. – marker mas cząsteczkowych, 50-2 000 pz (Sigma, St. Louis, USA), ścieżki 2., 3. – produkt, w którym nie stwierdzono mutacji genu BRCA1, ścieżka 4. – produkt z mutacją Ex20insC w genie BRCA1, ścieżka 5. – kontrola produktu PCR po trawieniu enzymem restrykcyjnym AvaII

Tab. I. Częstość apoptozy w grupie chorych na raka piersi i w grupie kontrolnej

Pacjentki z rakiem piersi (n=40)		Grupa kontrolna (n=42)	
apoptoza obecność	brak	apoptoza obecność	brak
12 (0,30) ^a	28 (0,70)	14 (0,33)	28 (0,67)

^a $P > 0,05$ w porównaniu z kontrolą

Tab. II. Apoptoza u chorych na raka piersi^a o różnym stopniu zaawansowania nowotworu

stopień ^b	I (n=17)		II (n=16)		III (n=7)	
	liczebność	częstość	liczebność	częstość	liczebność	częstość
brak	13	0,77	11	0,69	4	0,57
obecność	4	0,23	5	0,31	3	0,43

^a $n=40$; ^bwg skali Scarfa-Blooma-Richardsona



Dyskusja

Rak piersi dotyka co dziesiątą kobietę w krajach uprzemysłowionych i jest główną przyczyną ich śmierci. Rak piersi może zachodzić sporadycznie lub być uwarunkowany dziedzicznie. Raki sporadyczne stanowią ok. 95% przypadków, tylko 5% raków piersi jest uwarunkowanych dziedzicznie [17]. Istotny jest fakt, że raki piersi uwarunkowane dziedzicznie dotyczą osoby w młodym wieku.

Dane literaturowe wskazują na związek BRCA1 z naprawą DNA [18]. BRCA1 odgrywa także istotną rolę w regulacji procesu apoptozy. Badano związki pomiędzy genem BRCA1 a genami odpowiadającymi za proces apoptozy, jak bcl-2, bax oraz p53 w raku piersi [19]. Ekspresja BRCA1 korelowała pozytywnie z ekspresją bcl-2, czego nie zaobserwowano w przypadku bax i p53. Dane sugerują, że bcl-2 może być istotnym genem współdziałającym z BRCA1 w procesie nowotworzenia.

Apoptoza jest zjawiskiem zachodzącym w przypadku nowotworów i wydaje się mieć istotne znaczenie dla ich występowania. Podwyższoną częstość apoptozy stwierdza się w raku piersi typu przewodowego [20, 21]. Wysoki poziom apoptozy w tym nowotworze może być związany z krótszym czasem przeżycia [22, 23] i może być niezależnym czynnikiem prognostycznym [24, 25].

Aby stwierdzić fakt, czy komórki nowotworowe od chorych na raka piersi podlegają kontroli poprzez proces apoptozy, genomowy DNA był izolowany z krwi uzyskanej od chorych leczonych w Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Analizę DNA prowadzono z zastosowaniem klasycznej elektroforezy w że-

lu agarozowym. 30% pacjentek z rakiem piersi reprezentowało uszkodzenia DNA charakterystyczne dla procesu apoptozy; 14 z 42 próbek kontrolnych (33%) charakteryzowało się zmianami apoptotycznymi, czyli w podobnej skali, co w przypadku grup badanych. Przeprowadzone analizy histologiczne wskazują na brak korelacji pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworów a liczbą komórek apoptotycznych.

Wykrywanie apoptozy przy zastosowaniu elektroforezy w żelu agarozowym polega na określaniu stopnia fragmentacji DNA [25]. W obecnej pracy wykazano, że apoptoza może być z sukcesem wykrywana w limfocytach krwi obwodowej przy użyciu powyższej metody.

W grupie 40 kobiet z rakiem piersi mutację w genie BRCA1 stwierdzono tylko w 1 przypadku III stopnia zaawansowania nowotworu. W tym przypadku stwierdzono także apoptotyczne uszkodzenia DNA.

Badania wskazują, że zmiany genetyczne, jak mutacje BRCA1 i apoptotyczne uszkodzenia DNA mogą być wykrywane w raku piersi. Przeprowadzone wstępne analizy sugerują, że proces apoptozy może być związany z występowaniem i/lub progresją raka piersi. Brak mutacji BRCA1 w większości przypadków sugeruje na fakt uczestnictwa innych genów w procesie nowotworzenia, które być może nie zostały jeszcze poznane. Jednakże kolejne badania, obejmujące większą populację chorych są konieczne dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

Praca powstała w oparciu o granty 3P05C06624 i 3P05E07124 uzyskane z Komitetu Badań Naukowych (KBN).

Summary

Aim: *The breast cancer susceptibility gene BRCA1 encodes a large multi-functional protein which is implicated as a caretaker of the genome, through its role in regulation of DNA damage response pathways, including apoptosis. Apoptotic cell death plays important role in the pathogenesis and disease progression of cancer as well as in the response to treatment. The objectives of this study were to determine the frequency of BRCA1 germ-line mutations and apoptosis in patients with breast cancer.*

Materials and methods: *40 breast cancer women provided blood for genetic analysis. Blood samples age matched healthy individuals (n=42) served as control. The BRCA1 mutations were determined by PCR-RFLP methods. The apoptotic peripheral blood cells were detected by agarose gel electrophoresis.*

Results: *The apoptotic cells were identified in 30% (12/40) of the patients. There were no significant differences in apoptosis frequencies between patients and controls ($P > 0.05$). one Ex20insC mutations of BRCA1 gene were identified in breast cancer patients.*

Conclusion: *The presence of apoptotic peripheral blood cells in patients suggests a potential role of apoptosis in risk breast cancer appearance. The lack of detectable BRCA1 germ-line mutations in most cases suggests that there are probably additional, as yet unidentified genes predisposing to this disease.*

Key words: *BRCA1, apoptosis, breast cancer, gene mutations*



Piśmiennictwo

1. Futreal PA, Liu QY, Shattuck-Eidens D, et al. *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. Science 1994; 266: 120-2.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science 1994; 266: 66-71.
3. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. *Identification of the breast cancer gene BRCA2*. Nature 1995; 378: 789-92.
4. Wooster R, Neuhausen S, Mangion J, et al. *Location of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. Science 1994; 265: 2088-90.
5. Yoshida K, Miki Y. *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. Cancer Sci 2004; 95: 866-71.
6. Lane TF. *BRCA1 and transcription*. Cancer Biol Ther 2004; 3: 528-33.
7. Ting NS, Lee WH. *The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever*. DNA Repair (Amst) 2004; 3: 935-44.
8. Dubrovskaya A, Kanamoto T, Lomnytska M, et al. *TGFbeta1/Smad3 counteracts BRCA1-dependent repair of DNA damage*. Oncogene; 2005: 24, 2289-97.
9. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972; 26: 239-57.
10. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BW. *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer 1994; 73: 2013-26.
11. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, et al. *BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy*. J Cell Biochem 1996; 60: 23-32.
12. Song Q, Kuang Y, Divit VM, Vincenz C. *BOO, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1*. EMBO J 1999; 18: 167-78.
13. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, et al. *Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis*. Int J Cancer 1995; 60: 854-9.
14. Miyashita T, Reed JC. *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell 1995; 80: 293-9.
15. Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, et al. *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. Oncogene 1998; 16: 1713-21.
16. Parton M, Dowsett M, Smith I. *Studies of apoptosis in breast cancer*. BMJ 2001; 322: 1528-32.
17. Garber JE, Offit K. *Hereditary cancer predisposition syndromes*. J Clin Oncol 2005; 23: 276-92.
18. Brugarolas J, Jacks T. *Double indemnity: p53, BRCA and cancer p53 mutation partially rescues developmental arrest in Brca1 and Brca2 null mice, suggesting a role for familial breast cancer genes in DNA damage repair*. Nature Med 1997; 7: 721-2.
19. Yang Q, Yoshimura G, Nakamura M, et al. *Correlation between BRCA1 expression and apoptosis-related biological parameters in sporadic breast carcinomas*. Anticancer Res 2002; 22: 3615-9.
20. Gandhi A, Holland PA, Knox WF, et al. *Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast*. Br J Cancer 1998; 78: 788-94.
21. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, et al. *Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis*. Eur J Cancer 1994; 14: 2068-73.
22. Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, et al. *Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma*. Cancer 1998; 82: 1296-302.
23. Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, et al. *Apoptotic index correlates to bcl-2 and p53 protein expression histological grade and prognosis in invasive breast cancer*. Anticancer Res 1998; 18: 1989-98.
24. De Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. *Number of apoptotic cell as a prognostic marker in invasive breast cancer*. Br J Cancer 2000; 82: 368-73.
25. Gonzalez-Campora R, Galera Ruiz MR, Vazquez Ramirez F, et al. *Apoptosis in breast carcinoma*. Pathol Res Pract 2000; 196: 167-74.

Adres do korespondencji

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

