

Wykrywanie apoptozy metodą elektroforezy w żelu agarozowym u chorych na raka piersi

Detection of apoptosis by agarose gel electrophoresis in breast cancer patients

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Elżbieta Kozłowska¹, Tomasz Stetkiewicz², Andrzej Kulig¹, Tomasz Pertyński²

Cel. Wyróżnia się 2 rodzaje śmierci komórkowej: przypadkowa śmierć komórki (martwica) i programowana śmierć komórki (apoptoza). W obecnej pracy przedstawiono metodę elektroforezy w żelu agarozowym, która może być stosowana do prawidłowej charakterystyki programowanej śmierci komórki.

Materiały i metody. Proces apoptozy był analizowany u chorych na raka piersi ($n = 60$). Próbkę krwi uzyskano od 31 kobiet w wieku przedmenopauzalnym (średnia wieku $\pm SD$ 42,34 \pm 4,52 lata) i od 29 kobiet w wieku pomenopauzalnym (średnia wieku $\pm SD$ 66,53 \pm 6,67 lat).

Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej ($n = 52$).

Wyniki. Uszkodzenia DNA zostały zidentyfikowane u 63% (38/60) kobiet chorych na raka piersi. Liczba pozytywnych przypadków była znacząco wyższa wśród próbek rakowych niż kontrolnych ($P < 0,05$).

Wniosek. W obecnej pracy wykazano wysoką częstość apoptozy w limfocytach krwi obwodowej w raku piersi przy zastosowaniu metody elektroforezy w żelu agarozowym.

Słowa kluczowe: rak piersi, apoptoza, elektroforeza w żelu agarozowym

(Przegląd Menopauzalny 2003; 3:73–78)

Wstęp

Apoptoza, w przeciwieństwie do martwicy, jest procesem czynnym, często związanym z aktywacją genów. Określana jest mianem aktywnej śmierci komórki. Charakteryzuje ją szereg specyficznych zmian morfologicznych i biochemicznych (ryc. 1.). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie apoptozą, jako istotnym czynnikiem przyczyniającym się do powstawania i rozwoju nowotworów [1, 2].

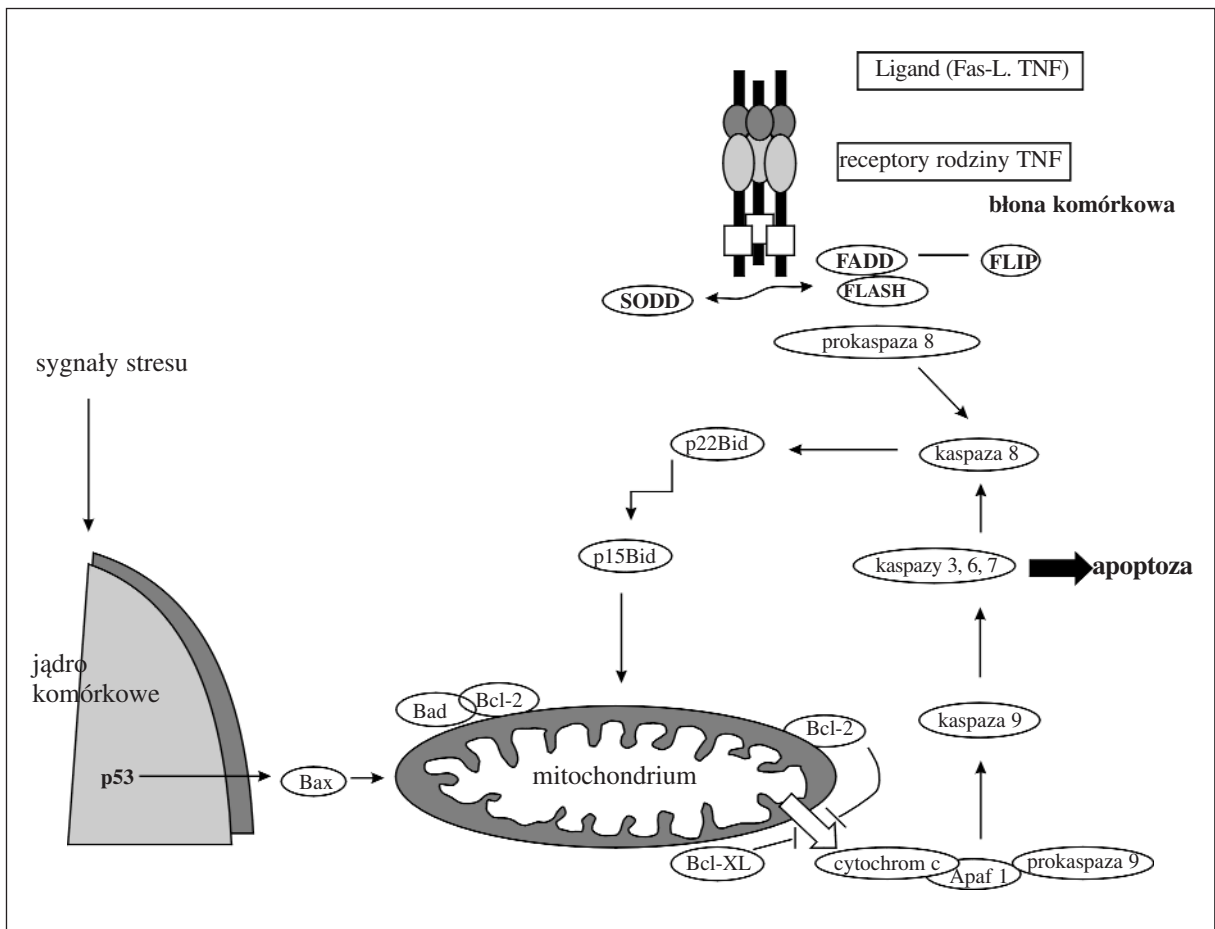
Dane literaturowe wskazują, że proces apoptozy zachodzi bardzo często w raku piersi [3–6]. W przypadku tego nowotworu znanych jest obecnie wiele czynników prognostycznych (tab. I.). Wymienione czynniki nie dają jednakże pełnego obrazu biologii nowotworu [7–9].

Wiadomo, że uwolnienie się komórek spod prawidłowego mechanizmu ich umierania odgrywa ważną rolę w patogenezie i progresji raka piersi [4, 10–13].

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

² Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. med. T. Pertyński





Ryc. 1. Czynniki regulujące proces apoptozy

Apoptoza, w przeciwieństwie do martwicy jest czynną śmiercią komórki, wymagającą w swym przebiegu syntezy RNA i białka. Kluczową rolę w regulacji apoptozy odgrywają białka z rodziny Bcl-2 [14–17]. Są to bardzo konserwatywne białka, których homologi występują na różnych etapach rozwoju filogenetycznego zarówno u wirusów, nicieni, jak i kręgowców. Rodzinę Bcl-2 dzieli się na 3 podrodziny: 1) podrodzinę Bcl-2, 2) podrodzinę Bax oraz 3) podrodzinę BH3. Białka z podrodziny Bcl-2 (występujące u ssaków Bcl-2, Bcl-xl, A1 z wyjątkiem Bcl-xs) są inhibitorami apoptozy, natomiast białka z podrodziny Bax (Bax, Bak, Bok) i BH3 (Bad, Bik, Bid) są promotorami aktywnej śmierci komórki. Cechą charakterystyczną większości białek z rodziny Bcl-2 jest występowanie C-terminalnej domeny transbłonowej, która umożliwia ich zakotwiczenie w błonach organeli: mitochondrialnych, siateczki śródplazmatycznej, jądrowej i aparatu Golgiego. Usunięcie domen kotwiczących białka w błonach powoduje ograniczenie ich zdolności jako regulatorów śmierci.

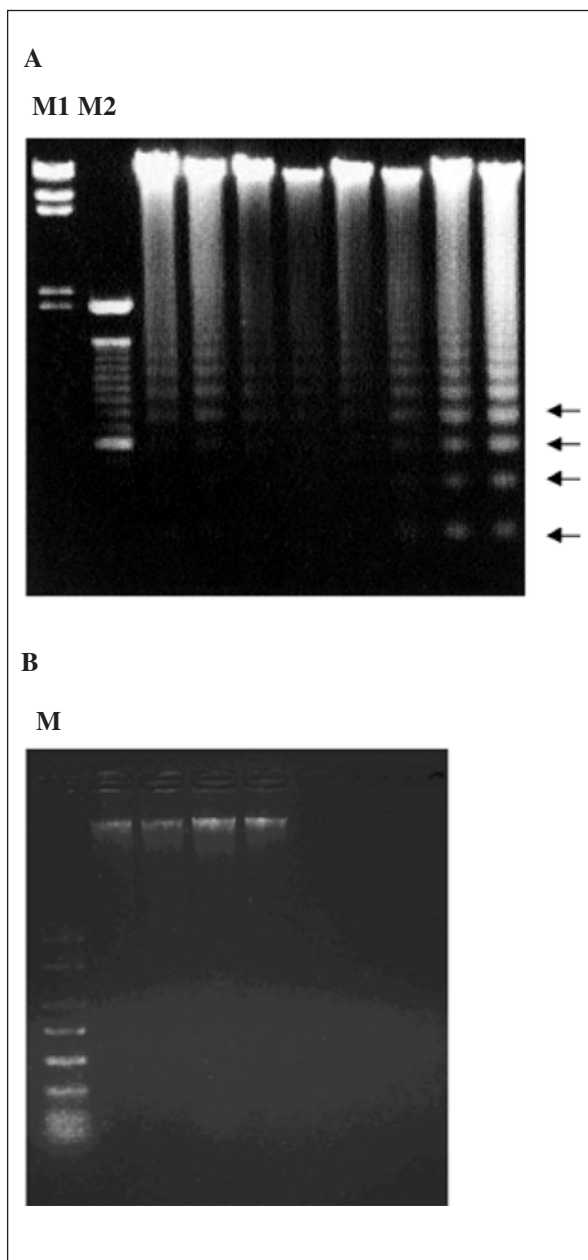
Białko Bcl-2 nie wydaje się być klinicznie użytecznym markerem predykcyjnym odpowiedzi na chemio-

terapię u chorych na raka piersi [10]. Natomiast redukcja ekspresji genu bax koreluje ze złą odpowiedzią na chemioterapię i krótszym czasem przeżycia [18–21].

Tab. I. Czynniki prognostyczne w raku piersi

typ histologiczny raka
rozmiar guza
stan węzłów chłonnych pachowych
stopień złośliwości histologicznej
stopień proliferacji komórek rakowych
ploidia DNA – czyli zawartość DNA w komórkach raka
wiek chorej
receptory steroidowe
biomarkery inwazyjności: aktywatory i inhibitory plazminogenu
receptory czynników wzrostu o aktywności kinazy tyrozynowej





Ryc. 2. Elektroforeza w żelu agarozowym DNA uzyskanego z limfocytów krwi obwodowej pobranych od chorych na raka piersi (ryc. A.) i od grupy kontrolnej (ryc. B.). Charakterystyczne dla procesu apoptozy drabinki apoptotyczne (ryc. A.) zostały oznaczone strzałkami. M1 marker długości par zasad λ -HindIII (Qiagen, Hilden, Germany), M2 marker długości par zasad – 100 bp ladder (Qiagen, Hilden, Germany), M – marker długości par zasad 50-2000 bp ladder (Sigma, St. Louis, USA).

W przeprowadzonych badaniach analizowano częstość apoptozy przy zastosowaniu klasycznej elektroforezy w żelu agarozowym w limfocytach krwi obwodowej kobiet z rakiem piersi.



Materiały i metody

Pacjentki z rakiem piersi. Krew do badań została uzyskana od 60 kobiet z rakiem piersi. Krew pobrano od 31 kobiet w wieku przedmenopauzalnym (średnia wieku \pm SD 42,34 \pm 4,52 lat) i od 29 kobiet w wieku pomenopauzalnym (średnia wieku \pm SD 66,53 \pm 6,67 lat). Wszystkie nowotwory były klasyfikowane wg skali Scarffa-Blooma-Richardsona [22, 23].

Grupa kontrolna. Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet (n = 52), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej.

Izolowanie DNA

Genomowy DNA był izolowany z limfocytów krwi obwodowej pobieranej na cytrynian. Krew była traktowana roztworem lizującym (155 mM NH₄CL, 10 mM KHCO₃ i 1 mM EDTA, pH 7,4) a następnie buforem ekstrahującym (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS i 0,1 mg/ml proteinaza K, pH 8,2) w 57°C, przez całą noc. DNA był wytrącany roztworem 1,5 M NaCl i etanolem. Po przemyciu 70-procentowym etanolem próbka była rozpuszczana w wodzie i stężenie DNA zostało określone poprzez pomiar absorbancji przy długości fali λ = 260 nm. Trzy mikrogramy DNA zostały poddane elektroforezie w 1-procentowym żelu agarozowym, z użyciem buforu elektroforetycznego TBE (0,09 M Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8,3). Elektroforeza została przeprowadzona z zastosowaniem napięcia 5 V/cm. Żel był barwiony bromkiem etydy w stężeniu 1 mg/ml i oglądany w świetle UV (ryc. 2.).

Analiza statystyczna

Żaden z parametrów odnoszących się do materiału nowotworowego nie podlegał rozkładowi normalnemu (test Smirnowa-Kolmogorova) i dlatego dla analizy wyników zastosowano testy nieparametryczne. $P < 0,05$ było traktowane jako wynik statystycznie znaczący.

Wyniki

Częstość apoptozy u chorych na raka piersi i w kontroli została przedstawiona w tab. II. 38 z 60 próbek rakowych (63%) charakteryzowało się obecnością apoptotycznych uszkodzeń DNA w limfocytach krwi obwodowej natomiast 14 z 52 przypadków kontrolnych (27%) wykazywało fragmentację DNA. Obecność drabinek apoptotycznych w komórkach rakowych była wyższa niż w komórkach prawidłowych ($P < 0,05$).

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

Pacjentki z rakiem piersi (n = 60)		Grupa kontrolna (n = 52)	
apoptoza		apoptoza	
obecność	brak	obecność	brak
38 (0,63) ^a	22 (0,37)	14 (0,27)	38 (0,73)

^a $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą

Wśród apoptotycznie pozytywnych próbek 17 pochodziło od kobiet w wieku przedmenopauzalnym i 21 od kobiet w wieku pomenopauzalnym. Analiza częstości apoptozy pomiędzy tymi grupami wykazała brak statystycznie istotnych różnic (test Mann-Whitney U, $P = 0,051$).

Dyskusja

Apoptoza to genetycznie uwarunkowany proces fizjologiczny, rozpoznawany jako charakterystyczne zmiany biochemiczne i morfologiczne komórek, prowadzący poprzez proteolityczną i nukleolityczną degradację składników komórki do jej śmierci [1, 24–26].

Apoptoza stanowi odpowiedź komórki na działanie wielu czynników stresogennych, w tym zwłaszcza na uszkodzenia DNA, wywołane bardzo różnymi związkami stosowanymi w chemioterapii nowotworów czy też promieniowaniem γ i UV. Do induktorów apoptozy zalicza się niedotlenienie, szok termiczny, usunięcie czynników wzrostowych, perturbacje przebiegu cyklu komórkowego, aktywację określonych receptorów błonowych i wiele innych.

Proces apoptozy może być kontrolowany przez mechanizmy wewnątrzkomórkowe, które wydają się być zależne od białka p53, lub przez czynniki zewnętrzne, takie jak hormony, cytokiny i leki antynowotworowe [20, 27–29]. W raku piersi defekt w ekspresji mRNA bax oraz białka Bax jest kluczowym promotorem apoptozy [30]. Przywrócenie ekspresji genu Bax w liniach komórkowych raka piersi hamuje rozwój nowotworu [31] i podwyższa czułość terapii cytostatykami [32, 33]. W liniach komórkowych redukcja ekspresji Bax jest negatywnym czynnikiem prognostycznym w nie-Hodkinowskich chłoniakach [34], raku jajnika [35] i raku trzustki [36].

W celu wykazania, czy komórki nowotworowe od chorych na raka piersi podlegają kontroli poprzez proces apoptozy, przeprowadzono analizę DNA z zastosowaniem klasycznej elektroforezy w żelu agarozowym.



Genomowy DNA był izolowany z krwi uzyskanej od chorych leczonych w Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Ryc. 2. przedstawia wynik uzyskany w przypadku pacjentek (ryc. A.) i osób zdrowych (ryc. B.), gdzie nie wykryto fragmentacji DNA. 63% pacjentek z rakiem piersi reprezentowało uszkodzenia DNA charakterystyczne dla procesu apoptozy; 14 z 52 próbek kontrolnych (27%) charakteryzowało się zmianami apoptotycznymi, jednak nie na tę skalę, co w przypadku grup badanych.

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.

Praca powstała w ramach grantów uzyskanych z Komitetu Badań Naukowych nr 3P05C 066 24 i 3 P05C 06923.

Summary

Purpose: Two alternative modes of cell death are distinguished: the first one is an accidental cell death (necrosis) and the second one is programmed cell death (apoptosis). The present study shows agarose gel electrophoresis method that should be used for a proper characterisation of cell death.

Materials and methods. The apoptosis was analysed in blood cells of breast cancer patients ($n = 60$). Tissue samples were collected from 31 premenopausal women (mean age \pm SD 42.34 \pm 4.52 years) and from 29 postmenopausal women (mean age \pm SD 66.53 \pm 6.67 years). Blood samples from age matched healthy women served as control ($n = 52$).

Results. The apoptotic cells were identified in 63% (38/60) of the breast cancers patients. The number of positive samples were significantly higher among cancer samples than among control samples ($P < 0.05$).

Conclusion. In the present work the high frequency of apoptotic peripheral blood cells in breast cancer using agarose gel electrophoresis methods was detected.

Key words: breast cancer, apoptosis, agarose gel electrophoresis

Piśmiennictwo

1. 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.
2. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer and Metastasis Reviews 1992; 11: 95-103.
3. Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. Endocr Relat Cancer 1999; 6: 13-6.
4. Mendez O, Manas S, Fabra A, et al. Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 2001; 65: 171-7.
5. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, et al. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 2000; 18: 3775-81.
6. Codegoni AM, Bertoni F, Colelle G, et al. Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer. Oncol Res 1999; 11: 297-301.
7. Berek JS, Fu YS, Hacker NF. Ovarian cancer. In: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA (editors). Novak's Gynecology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. pp 1155-1230.
8. McGuire W, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. N Engl J Med 1992; 326: 1756-61.
9. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. N Engl J Med 1998; 339: 974-84.
10. Baekelandt M, Kristensen GB, Nesland JM, et al. Clinical significance of apoptosis related factors p53, Mdm2, and Bcl-2 in advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 1999; 17: 2061.
11. Villa R, Folini M, Perego P, et al. Telomerase activity and telomere length in human ovarian cancer and melanoma cell lines: correlation with sensitivity to DNA damaging. Int J Oncol 2000; 16: 995-1002.
12. Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, et al. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. Endocr Relat Cancer, 1999; 6: 29-40.
13. Vakkala M, Lahtenmaki K, Raunio H, et al. Apoptosis during breast carcinoma progression. Clin Cancer Res, et al. 1999; 5: 319-24.



14. Zhang G J, Kimijima I, Watanabe T, et al. *Correlation between apoptotic index, bcl-2 protein expression and progression and prognosis in breast carcinoma*. Gan To Kagaku Rycho. 1998; 25: 415-21.
15. Reed JC. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J Cell Biol 1994; 124: 1-6.
16. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, 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.
17. 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.
18. Shilkaitis A, Graves J, Mehta RR, et al. *BCL-2 and BAX are differentially expressed in hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis*. Cell Growth Differ 2000; 11: 437-45.
19. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, et al. *Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene*. Int J Cancer 2000; 87: 517-21.
20. Maciorowski Z, Kljanienko J, Padoy E, et al. *Differential expression of Bax and Bcl-2 in the assessment of cellular dynamics in fine-needle samples of primary breast carcinoma*. Cytometry 2000; 42: 264-9.
21. Shilkaitis A, Graves J, Mehta RP, et al. *Bcl-2 and Bax are differentially expressed in hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis*. Cell Growth Differ 2000; 11: 437-45.
22. Bloom H J G., Richardson WW. *Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years*. Br J Cancer 1957; 11: 359-77.
23. Scarf RW, Torloni H. *Histological typing of breast tumors*. Geneva: World Health Organization, pp 13-20.
24. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer 1994; 73: 2013-26.
25. Compton MM. *A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome*. Cancer Metastasis Rev 1992; 11: 105-9.
26. Searle J, Kerr J F, Bishop CJ. *Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance*. Pathol Annu 1982; 17: 229-59.
27. Miyashita T, Reed JC. *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell 1995; 80: 293-9.
28. Ouyang H, Furukawa T, Abe T, et al. *The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach and endometrium*. Clin Cancer Res 1998; 4: 1071-4.
29. Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Troger M, et al. *Apoptosis bcl-2 expression and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: An approach using multiparameter flow cytometry*. Gynecol Oncol 2000; 77: 11-7.
30. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, et al. *Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumour growth in SCID mice*. J Clin Invest 1996; 97: 2651-9.
31. 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.
32. Wagener C, Bargou RC, Daniel PT, et al. *Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast cancer cells to drug-induced apoptosis*. Int J Cancer; 1996, 67: 138-41.
33. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van DT. *Bax suppresses tumorigenesis and stimulates in vivo*. Nature 1997; 385: 637-40.
34. Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewsky S, et al. *Prognostic significance of BAX protein expression in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphoma*. Blood 1997; 90: 3173-8.
35. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, et al. *BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol 1998; 16: 2583-90.
36. Friess H, Lu Z, Graber HU, et al. *Bax but not bcl-2 influences the prognosis of human pancreatic cancer*. Gut, 1998; 43: 414-21.

Adres do korespondencji

dr n. med. Beata Smolarz
Pracownia Biologii Molekularnej
Zakład Patomorfologii Klinicznej
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
ul. Rzgowska 281/289
93-338 Łódź

