původní práce

EXPRESE GENŮ *BCL-2* A *BAX-1* VE TKÁNI Ta, T1 UROTELIÁLNÍCH KARCINOMŮ MOČOVÉHO MĚCHÝŘE A JEJICH PROGNOSTICKÝ VÝZNAM

EXPRESSION OF *BCL-2* AND *BAX-1* GENES IN THE TISSUE OF Ta T1 UROTHELIAL CARCINOMA AND THEIR PROGNOSTIC VALUE

Monika Szakácsová[1], Viktor Soukup[1], Marko Babjuk [2], Jaroslav Mareš[3], Jaroslava Dušková[4], Tomáš Hanuš[1]

[1]Urologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha
[2]Urologická klinika FN Motol a 2. LF UK, Praha
[3]Ústav biologie a lékařské genetiky 2.L F UK a FN Motol, Praha
[4]Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

Došlo: 19. 4. 2013.
Přijato: 10. 6. 2013.

Kontaktní adresa
MUDr. Monika Szakácsová
Urologická klinika 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 6, 128 00 Praha 2
e-mail: monika.szakacsova@vfn.cz

Podpořeno MPO TIP FR-TI3/666.

Střet zájmů: žádný.

Souhrn

Szakácsová M, Soukup V, Babjuk M, Mareš J, Dušková J, Hanuš T. Exprese genů *BCL-2* a *BAX-1* ve tkáni Ta, T1 uroteliálních karcinomů močového měchýře a jejich prognostický význam

Cíl:
Cílem studie bylo zjistit prognostický význam exprese genů *BCL-2* a *BAX-1* u Ta T1 uroteliálního karcinomu močového měchýře.

Materiál a metoda:
Do studie bylo zařazeno celkem 84 pacientů s primozáchytem Ta, T1 uroteliálního karcinomu močového měchýře. U 48 pacientů šlo Ta, u 36 pacientů o T1 nádor, G1 nádor mělo 23 pacientů, 45 G2 a 16 pacientů G3 nádor. K recidivě došlo během sledování u 38 pacientů, k progresi u čtyř pacientů. Průměrná délka sledování byla 23,64 měsíců. Míra exprese *BCl-2* a *BAX-1* byla stanovena pomocí RT-PCR a vyjádřená semikvantitativně. Jako srovnávací gen byl použit gen Glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenázy (GAPDH).

Výsledky:
Z 84 nádorových vzorků byla exprese *BCl-2* v 80 případech (95,2 %) a exprese *BAX-1* v 72 případech (85,7 %). Korelace mezi recidivou nádoru a expresí genů nebyla statisticky významná. Statisticky významná byla pouze souvislost mezi mírou exprese *BAX* a mírou histologické diferenciace tumoru (p = 0,0459). Prognostický význam exprese genů ve vztahu k progresi onemocnění nebyl hodnocen pro malý počet událostí.

Závěr:
U nemocných s Ta, T1 karcinomem močového měchýře jsme nepotvrdili prognostický význam exprese genů *BCl-2* a *BAX-1*. Statisticky významná byla jen souvislost mezi mírou exprese *BAX-1* a histologickou diferenciací nádoru.

Klíčová slova:
BAX-1, *BCL-2*, progrese, recidiva, uroteliální karcinom.

Summary

Szakácsová M, Soukup V, Babjuk M, Mareš J, Dušková J, Hanuš T. Expression of *BCL-2* and *BAX-1* genes in the tissue of Ta, T1 urothelial carcinoma and their prognostic value

Aim:
The aim of this study was to evaluate the prognostic value of *BCL-2* and *BAX-1* gene expression in the tissue of non-muscle invasive superficial urothelial carcinoma.

Methods:
This study included 84 patients with Ta, T1 urothelial carcinoma of the bladder treated with transurethral resection. Mean follow-up was 23.64 months. Histopathological diagnosis of Ta was made in 48 patients, T1 in 36 patients, 23 patients were diagnosed with grade G1 tumor, 45 with grade G2 and 16 with grade G3. During the course of follow-up, tumor recurrence developed in 38 patients and progression was observed in 4 patients. The expression of *BCL-2* and *BAX-1* was examined using RT-PCR and determined using semi quantitatively. Gene glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenasy *(GAPDH)* was used as the comparative gene.

Results:
Expression of *BCL-2* was detected in 80 cases (95.2%) and the expression of *BAX-1* in 72 cases (85.7%). The correlation between tumor recurrence and gene expression was not statistically significant. A statistically significant correlation was identified between the expression of *BAX* and grade of the tumor ($p = 0.0459$). The prognostic value of gene expression, with regard to disease progression, was not evaluated due to a small sample size.

Conclusions:
A significant correlation between the degree of *BAX-1* expression and tumor grade was identified. No significant correlations were documented between gene expression and the other parameters studied.

Key words:
BAX-1, *BCL-2*, progression, recurrence, transitional cell carcinoma.

ÚVOD

Nádory močového měchýře jsou 7. nejčastější malignitou u mužů a 17. u žen. Incidence v České republice v roce 2010 dosáhla 30,88/100 000 mužů a 10,92/100 000 žen a mortalita byla 11,59/100 000 mužů a 3,82/100 000 žen (1). Karcinom močového měchýře (KMM) neinfiltrující svalovinu (kategorie Ta a T1) se vyznačuje častými recidivami a možnou progresí (2). Jako prognostické faktory v praxi využíváme hlavně klinické parametry, jako je grade tumoru, rozlišení Ta a T1 dle TNM klasifikace, velikost, multiplicita tumoru, přítomnost karcinomu in situ (Cis) a předchozí chování nádoru (četnost recidiv v anamnéze) (2).

Velká pozornost je věnována genetickým markerům, které by umožnily individuální předpověď chování onemocnění. Mezi nejznámější vyšetřované geny patří Gen *TP 53*. Jeho poškození vede k zamezení naprogramované buněčné smrti – apoptóze. Mutace genu *TP 53* je spojována se špatnou diferenciací nádoru a jeho invazivním růstem (3). Je popsáno množství genů regulovaných cestou p53, mezi

které patří i gen *BCl-2* a *BAX* (4). Cílem naší práce bylo zhodnotit prognostický význam tkáňové exprese těchto dvou genů.

METODIKA

Do studie bylo zařazeno celkem 84 pacientů s primozáchytem Ta, T1 uroteliálního karcinomu močového měchýře léčených transuretrální resekcí. Transuretrální resekce močového měchýře byla prováděna standardní technikou s odstraněním všech viditelných tumorů, vždy byla odebrána biopsie z bazální části tumoru. Výkon byl ukončen v případě, že při přehledné cystoskopii s použitím 70º optiky, nebyl patrný žádný viditelný tumor. Část nádorové tkáně byla bezprostředně po odebrání zmražena v tekutém dusíku a následně skladována při –70 °C až do doby extrakce RNA. Zbytek nádorové tkáně byl fixován ve formolu a odeslán k běžnému histologickému vyšetření. Hloubka nádorové invaze byla hodnocena pomocí systému TNM (5). Míra histologické diferenciace podle sytému WHO 1973 (6).

Sledovací protokol obsahoval pravidelné vyšetření cytologie moče a cystoskopie. První kontrola byla vždy 3 měsíce od operace, další pak podle charakteristiky primárního tumoru. Sledování probíhalo dle aktuálních evropských doporučení. V případě podezřelého nálezu při cystoskopii byl pacient indikován k transuretrální resekci v narkóze nebo k biopsii. Za progresi byl považován nález infiltrujícího nádoru (T2 a více). Každá recidiva i progrese byly ověřeny histologickým vyšetřením.

Izolace mRNA byla prováděna prostřednictvím kitu Oligotex Direct mRNA Midi kit (Qiagen) podle doporučeného postupu výrobcem. U všech nádorových vzorků byl proveden stejný postup. K ověření, zda vyšetřované vzorky obsahují ekvivalentní množství RNA, byly všechny testovány na přítomnost genu glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenasy *(GAPDH)*. Protokol k PCR byl u všech genů stejný a skládal se z reverzní transkripce

Tab. 1. *Soubor pacientů*
Table 1. *Patients' characteristic*

Ženy/muži	18/66
Věk (roky)	průměr 66,44 ± 11,94 let (rozmezí 17–88)
Solitární/mnohočetný	44/40
Velikost nádoru (cm)	3,32 ± 1,92
Ta/T1	48/36
G1/G2/G3	23/45/16
Průměrná doba sledování (měsíce)	23,64 ± 10,72
Recidiva onemocnění	38 pacientů

po dobu 30 minut při 50 °C, aktivačního startovacího kroku polymerázové řetězové reakce po dobu 15 minut při 95 °C, 35 cyklů denaturace 1 minuta při 94 °C. Dalším krokem procesu byla hybridizace primerů 1 minutu při 65 °C, extenze 1 min při 72 °C a finální extenze po dobu 10 minut při 72 °C. Přehled primerů je v tabulce 2.

Produkty PCR byly separovány elektroforeticky na 2% agarózovém gelu. Gel byl barven ethidium bromidem a množství PCR produktů bylo kvantifikováno prostřednictvím Kodak Digital Science ID.

Ke statistickému hodnocení dat byl použit S.A.S. software release 8.2 (SAS Inc., Cary, NC, USA). Souvislost mezi mírou exprese *BCL-2*, *BAX* a poměru *BCL-2/BAX* a klinickopatologickými charakteristikami tumoru (hloubka nádorové invaze, míra histologické diferenciace, multiplicita a velikost nádoru) byla zkoumána prostřednictvím χ-square testu nebo Fischerova exaktního testu. Kaplan-Meierova metoda byla použita k výpočtu charakteristik přežití a rozdíly hodnoceny pomocí log-rank testu. Multivariantní analýza přežití byla provedena prostřednictvím Coxova regresního modelu proporcionálních rizik.

Tab. 2. *Použité primery*
Table 2. *Used primeres*

GAPDH	5´-AGATCCCTCCAAAATCAA-3´	5´-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3´
BAX-1	5´-GATGCGTCCACCAAGAAGC-3´	5´-TGAGCACTCCCGCCACAA -3´
BCL-2	5´CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3´	5´-CGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3´

Tab. 3. *Vztah exprese genů a diferenciace nádoru*
Table 3. *Correlation of gene expression and tumor differentiation*

	Hodnota p
BCL-2	0,17
BAX-1	0,447
BCL-2/BAX-1	0,0459

VÝSLEDKY

Do studie bylo zařazeno 84 pacientů operovaných v období od června 2003 do července 2007. Z 84 nádorových vzorků byla exprese *BCL-2* prokázána v 80 případech (95,2 %) a exprese *BAX-1* v 72 případech (85,7 %).

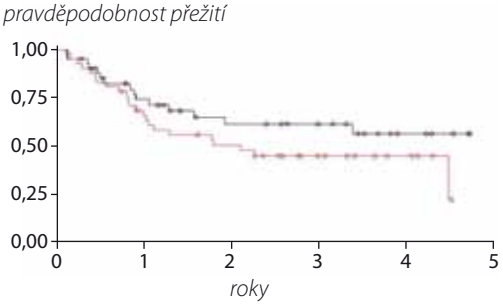
Při posuzování souvislosti mezi vyšetřovanými parametry a sledovanými klinickými prognostickými faktory (T, G, multifokalita a velikost tumoru) se jako statisticky významná ukázala pouze souvislost mezi mírou exprese *BAX* a mírou histologické diferenciace tumoru (p = 0,0459).

Nebyl prokázaný statisticky významný vztah mezí rizikem recidivy a mírou exprese genu *BAX* (Log-Rank p = 0.,1824; Wilcoxon p = 0,2647). Stejně tak se nepodařilo prokázat vztah mezi expresí *BCL-2*, respektive poměrem *BCL-2/BAX* a rizikem recidivy (Log-Rank p 0.8754 a Wilcoxon p = 0.0294, resp. Log-Rank p = 0,2928, Wilcoxon p = 0,3309).

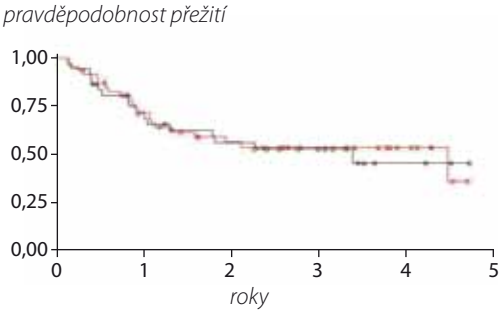
Při statistickém hodnocení souboru pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik ve vztahu k recidivě onemocnění nebyl prokázán vztah sledovaných parametrů (*BCL-2*, *BAX-1* a poměr *BCL-2/BAX-1*). Během sledování došlo ve zkoumaném souboru nemocných k progresi tumoru jen ve čtyřech případech, proto nebyl vztah genů a progrese analyzován.

DISKUSE

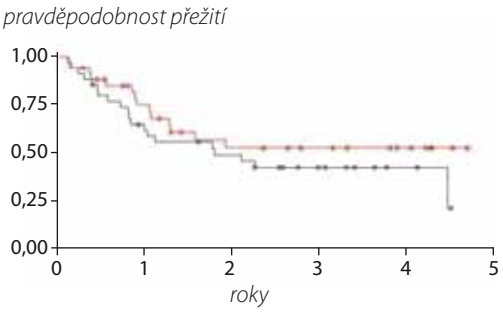
BCL-2 je protoonkongen lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 18 (18q21), který kóduje 26 kDa protein. Má za úkol blokovat apoptózu, aniž by ovlivňoval buněčnou proliferaci. Prodlužuje přežívání buňky spouštěnou genem p53, vede k zastavení buněčného cyklu v G0 fázi, a tím k nahromadění nádorových buněk a vzniku nádoru. Prognostický význam *BCL-2* u karcinomu močového měchýře



Graf 1. *Přežití bez recidivy nádoru u pacientů s BAX-1 > 0,1 (červená křivka) and BAX-1 < 0,1 (černá křivka)*
Graph 1. *Recurence free survival of patients with BAX-1 > 0,1 (Red line) and BAX-1 < 0,1 (black line)*



Graf 2. *Přežití bez recidivy nádoru u pacientů s BCL-2 > 0,4 (červená křivka) and BCL-2 < 0,4 (černá křivka)*
Graph 2. *Recurence free survival of patients BCL-2 > 0,4 (red line) and BCL-2 < 0,4 (black line)*



Graf 3. *Přežití bez recidivy nádoru u pacientů s BCl-2/BAX-1 > 3,2 (červená křivka) and BCL-2/BAX-1 < 3,2 (černá křivka)*
Graph 3. *Recurence free survival of patients BCl-2/BAX-1 > 3,2 (red line) and BCL-2/BAX-1 < 3,2 (black line)*

je kontroverzní. Podle některých studií byla zaznamenána souvislost mezi nízkým grade a hloubkou nádorové invaze a tedy s klinicky

méně agresivním genotypem (7, 8). Podle jiných naopak byla exprese zvýšena u nádorů s vyšším grade a vyšší hloubkou nádorové invaze. Exprese *BCL-2* by tak měla mít souvislost s vyšší četností recidiv a progresí a zkráceným přežíváním nemocných (9–12).

Gen *BAX* je člen rodiny genů *BCL-2*. Je lokalizován na 19. chromozomu, v oblasti q13,3–13,4 (13). *BAX* jako inhibiční homolog *BCL-2* je exprimován v povrchových vrstvách urotelu. To může vézt ke spekulaci, že *BCL-2* a *BAX* hrají klíčovou roli v obnově, proliferaci a diferenciaci urotelu (14). Poměr mezi *BCL-2*, jež inhibuje apoptózu a *BAX*, jež indukuje apoptózu, určuje potenciál progrese, proto by měly být tyto geny vyšetřovány společně (15). Prognostický význam *BCL-2* i *BAX-1* u KMM je kontroverzní, a to nejen v případě zkoumání exprese, ale i v případě použití imunohistochemie (16–17).

Podle některých je souvislost s vysokou mírou histologické diferenciace tumoru (nízkým nádorovým gradem) a hloubkou nádorové invaze, a tedy s klinicky méně agresivním genotypem (4), podle jiných naopak byla exprese zvýšena u nádorů s vyšším mírou histologické dediferenciace tumoru (vyšším gradem) a hlubší nádorovou invazí a kde exprese *BCL-2* souvisela s vyšší četností recidiv, progresí a zkráceným přežíváním nemocných (18).

V další práci výsledky s *BCL-2* nebyly klinicky signifikantní, ale pozitivita *BAX* znamenala delší dobu přežívání, a to s výsledkem p = 0,0002 (19).

Poměr mezi *BCL-2*, který inhibuje apoptózu a BAX, jenž apoptózu indukuje, by měl určovat potenciál recidivy a progrese. Námi tyto výsledky nebyly potvrzeny.

ZÁVĚR

Význam exprese *BCL-2* a *BAX*, jako prognostických markerů, u uroteliálního karcinomu močového měchýře nebyl prokázán. Taktéž poměr *BCL-2* a *BAX* ve vztahu k recidivě nebyl signifikantní. Významná se ukázala pouze souvislost mezi mírou exprese *BAX* a mírou histologické diferenciace tumoru.

LITERATURA

1. Uroweb.cz
2. **Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al.** Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. Eur Urol 2006; 49(3): 466–465.
3. **Soukup V, Babjuk M, Dušková J, et al.** p53 pozitivita v nenádorové sliznici u pacientů s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře. Čas. Lék. čes. 2007; 146(1): 63–67.
4. **Gazzaniga P, Gradilone A, Vercilo R, et al.** BCL-2, BAX mRNA expression ratio as prognostic factor in low grade urinary bladder cancer. Int J Cancer 1996; 69: 100–104.
5. **Sobin LH, Wittekind C.** UICC TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York: Wiley-Liss 2002.
6. **Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H (eds.)** International Classification of Tumors. Geneva: WHO 1973.
7. **Kirch EJ, Baunoch DA, Stadler WM.** Expression of bcl-2 and bcl-X in bladder cancer. J Urol, 1998; 159: 1348–1353.
8. **Wu TT, Chen JH, Leech, Juany JK.** The role of bcl-2, p53 and Ki-67 index in predicting tumour recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. J Urol 2000; 163: 758–760.
9. **King ED, Matteson J, Jacobs SC, Kyprianou N.** Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. Assotiation with tumour progression. J Urol 1996; 155: 316–320.
10. **Esring D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, et al.** P53 nuclear protein accumulation correlates with mutation in the p53 gene, tumor grade and stage in bladder cancor. Am J Pathol 1993; 143: 1289–1397.

11. **Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M.** Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. Urol Res 1998; 26: 235–241.
12. **Bilim V, Tomita Y, Kawasaki T, Katagiri A, Omak T, Takeda M, Takahashi K.** Prognostic value of bcl-2 and p53 expression in urinary tract transitional cell cancor. J Natl Cancer Indy 1996; 88: 686–688.
13. **Apte S, Matyek M, Olsen B.** Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript BAX delta. Genomics 1995; 26: 592–594.
14. **Korkolopoulou P, Lazaris Ach, Konstantinidou A, Kavantzas N, et al.** Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas relationship with apoptotic rate and survival. Eur Urol 2002; 41: 274–283.
15. **Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, et al.** Expression and prognostic significance of Livin, Survivin and other apoptosis related genes in the progression of superficial bladder cancer. Ann Oncol 2003; 14: 85–90.
16. **Touloupidis S, Fatles G, Kalaitzis C et al.** The significance of p53 and bcl-2 overexpression and other prognostic factors in transitional cell carcinoma of the bladder. Int Urol Nephrol 2006; 38(2): 231–236.
17. **Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, et al.** Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer, Anticancer Res 2002; 22(6B): 3759–3764.
18. **Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelier M.** Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumors. Histopathology 1996; 28: 135–140.
19. **Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, et al.** Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Cancer 2003; 88: 586–592.