



Expression of selected genes involved in transport of ions in papillary thyroid carcinoma

Monika Gałęza-Kulik, Jadwiga Żebracka, Sylwia Szpak-Ulczok, Aleksandra Krawczyk, Agnieszka Czarniecka, Aleksandra Kukulka, Elżbieta Gubała, Zoran Stojcev, Małgorzata Wiench

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology; MSC Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Abstract

Introduction: The studies of papillary thyroid cancer (PTC) gene expression profile have shown changes in expression of genes involved in transport of several ions. The aim of our study was a real-time PCR evaluation of three of them: *KCNJ2*, *SLC4A4* and *SLC34A2*.

Material and methods: The analysis was carried out in PTC tumors and normal thyroid samples gained from 38 patients. Real-time quantitative PCR (Q-PCR) was performed (Taqman) with β -glucuronidase (*GUS*) as the reference gene.

Results: We observed $20 \times$ increase of *SLC34A2* expression in PTC. This gene encodes $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{3-}$ cotransporter. Considerable increase of gene expression has been shown also for *KCNJ2*, encoding a potassium ion channel. *SLC4A4*, which encodes the $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^{2-}$ cotransporter, exhibited a 7-fold decrease in PTC.

Conclusions: The performed study revealed that *SLC34A2* gene exhibited the most distinct change in expression and may become a molecular marker of papillary thyroid cancer.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 57 (supl. A): A26–A31)

Key words: papillary thyroid carcinoma, gene expression, real-time quantitative PCR



Jadwiga Żebracka, MSc
Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,
M. Skłodowska-Curie Cancer Center and Institute
of Oncology, Gliwice Branch
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
phone: 032 278 93 03, fax: 032 278 93 25
e-mail: jzebracka@io.gliwice.pl



Ekspresja wybranych genów zaangażowanych w transport jonów w raku brodawkowatym tarczycy

Monika Gałęza-Kulik, Jadwiga Żebracka, Sylwia Szpak-Ulczok, Aleksandra Krawczyk, Agnieszka Czarniecka, Aleksandra Kukulska, Elżbieta Gubała, Zoran Stojcev, Małgorzata Wiench

Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej i Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Wstęp: Badania profilu ekspresji genów wykazały, że w raku tarczycy dochodzi do znaczących zmian w ekspresji szeregu genów kontrolujących transport różnych jonów przez błonę komórkową. Celem niniejszej pracy była ocena zmian w ekspresji dla trzech z nich: *KCNJ2*, *SLC4A4* i *SLC34A2*, poprzez badanie metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiło 38 próbek raka brodawkowatego tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) i odpowiadające im utkanie prawidłowe pobrane śródoperacyjnie. Ekspresję badanych genów oceniano przy użyciu ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Q-PCR, Taqman). Jako kontrolę endogenną zastosowano gen kodujący β -glukuronidazę (*GUS*).

Wyniki: Spośród analizowanych genów najwyższy, bo aż 20-krotny, wzrost ekspresji wykazał gen *SLC34A2* kodujący kotransporter fosforanu zależny od sodu. Znaczący wzrost ekspresji w PTC zaobserwowano również dla genu *KCNJ2*

kodującego kanał potasowy typu 2. Gen *SLC4A4*, kodujący kotransporter dwuwęglanu sodu, jako jedyny wykazał spadek ekspresji (7-krotny).

Wnioski: Wśród badanych genów najlepiej różnicującym PTC od tarczycy zdrowej okazał się gen *SLC34A2*. Konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia jego znaczenia diagnostycznego.

(*Endokrynol Pol* 2006; 57 (supl. A): A26–A31)

Słowa kluczowe: rak brodawkowaty tarczycy, ekspresja genów, ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym



Mgr Jadwiga Żebracka
Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice
tel.: 032 278 93 03, faks: 032 278 93 25
e-mail: jzebracka@io.gliwice.pl

Wstęp

Jak dotąd, mechanizmy kancerogenezy raka brodawkowatego tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) nie zostały jeszcze w pełni zidentyfikowane. Wiadomo, że najbardziej charakterystycznym zdarzeniem inicjującym transformację nowotworową w tym raku są chromosomowe rearanżacje protoonkogenu *RET* i *TRK* z jednej strony i mutacje *BRAF* z drugiej. Protoonkogeny *RET* i *TRK* są zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 10 (10q11.2) i 1 (1q32-41), a ich aktywację stwierdzono w około 33% (*RET*) i 17% (*TRK*) przypadków raków brodawkowatych u dorosłych [1]. W populacji polskiej rearanżacje *RET*/PTC są obecne w 27% przypadków PTC [2]. Odsetek ten zwiększa się do 80% w przypadkach przebytej ekspozycji na promieniowanie X i w grupie raków, które wystąpiły po awarii w Czarnobylu [3]. Mutacja *BRAF*^{T1796A}, która po raz pierwszy została opisana w raku jajnika i czerniakach (transwersja tyminy do adeniny w pozycji 1796), jest

najczęstszą mutacją tego genu w PTC — zidentyfikowano ją w 36–69% przypadków PTC [4]. Jej obecność wiąże się z bardziej agresywną postacią raka oraz inwazją pozatarczycową. Niewiele jednak wiadomo o molekularnych następstwach tych mutacji inicjujących.

Na poziomie mRNA ekspresja genów może być analizowana różnymi technikami, jak: Northern blot, Q-PCR, mikromacierze DNA. Szczególnie mikromacierze DNA, pozwalające na analizę kilkudziesięciu tysięcy genów podczas jednego badania, umożliwiają postęp w badaniach nad ekspresją genów w nowotworach tarczycy [5]. Metodą referencyjną pozostaje jednak metoda ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Q-PCR). We wcześniejszych badaniach profilu ekspresji genów, prowadzonych w naszym ośrodku [6], wykazano, że w raku tarczycy dochodzi do znaczących zmian w ekspresji wielu genów, w tym genów kontrolujących transport przez błonę komórkową różnych jonów. Celem prezentowanej pracy było potwierdzenie tych

Tabela I
Funkcje białek kodowanych przez analizowane geny

Table I
Functions of proteins encoded by analyzed genes

Gen	Funkcja białka kodowanego przez gen	Źródło
KCNJ2	Tworzy kanał jonowy biorący udział w transporcie jonów K ⁺ do wnętrza komórki, odgrywa istotną rolę w regulacji, kontroli i utrzymaniu pobudliwości komórek	[7–9]
SLC4A4	Kotransporter dwuwęglanu sodu, uczestniczy w transporcie Na ⁺ i HCO ₃ ²⁻ , bierze udział w utrzymaniu wewnątrzkomórkowego pH	[10, 11]
SLC34A2	Kotransporter fosforanu zależny od sodu; jest silnie wrażliwy na zmiany pH	[12]

zmian w ekspresji metodą ilościowej reakcji PCR dla trzech z nich: *KCNJ2*, *SLC4A4* i *SLC34A2* (tab. I).

Material i metody

Material do badań stanowiły fragmenty zdrowej i nowotworowo zmienionej tkanki tarczycy pobrane śródoperacyjnie od 38 chorych operowanych w Klinice Chirurgii Onkologicznej Instytutu Onkologii w Gliwicach (średnia wieku chorych 36 lat, zakres 5–78 lat).

Izolacja RNA

Całkowite RNA zostało wyizolowane z fragmentów tkanki o wielkości 30–50 mg przy użyciu RNeasy Total Midi, a następnie oczyszczone przy użyciu RNeasy Mini Kit (Qiagen) z trawieniem DNA-azą według zaleceń producenta. Stężenie RNA oznaczono metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorpcji światła w nadfiolecie przy długości fali 260 nm. Spektrofotometrycznie sprawdzano również czystość RNA. Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} mieściła się w granicach 1,8–2,1, co świadczyło o czystości preparatu (preparat był wolny od zanieczyszczeń białkami). Dokonano oceny jakościowej preparatu RNA, wykorzystując jako wzorzec wielkości marker pUCMix oraz marker RNA I.

Synteza cDNA

Syntezę cDNA przeprowadzono na matrycy wyizolowanego całkowitego RNA. Wykorzystano do tego celu cDNA Omniscript (Qiagen), w skład którego wchodzi: odwrotna transkryptaza RT-O zoptymalizowana w stosunku do enzymów AMV i MMLV, 10 × bufor RT, deoksyrybonukleotydy (dNTPs), startery Random Hexamery oraz woda wolna od RNaz.

Ilościowa analiza ekspresji poszczególnych genów

Ilościowa reakcja PCR przeprowadzona została w aparacie ABI PRISM 7700 na płytkach, z których każda zawierała 96 dołków. Na pojedynczej płytce oprócz badanych próbek nakładano rozcieńczenia standardów

w dwóch powtórzeniach oraz kontrolę negatywną, pozbawioną matrycy, również w dwóch powtórzeniach. Fluorescencję odczytywano przy długości fal odpowiadających barwnikowi FAM ($\lambda = 518$ nm), który był składnikiem sond dla poszczególnych genów, oraz przy długości fal odpowiadających barwnikowi VIC ($\lambda = 554$ nm), który wchodził w skład sondy dla kontroli wewnętrznej — genu *GUS*. Ustawiano odpowiednie parametry: zakres linii bazowej i linii odcięcia w takim miejscu, gdzie zaczynał się wzrost logarytmiczny, dla wszystkich płytek takie same: linia odcięcia — 0,02; linia bazowa — 3–16. Powstałe dane analizowano przy użyciu programu Sequence Detector i wyniki przedstawiano w postaci raportu, z którego odczytywano wartość Ct oraz wyznaczoną na podstawie krzywej standardowej względną ilość matrycy.

Statystyczna ocena wyników

Wyniki ekspresji genów poddawano analizie po przekształceniu logarytmicznym. Zgodność rozkładu wartości ekspresji genów z rozkładem normalnym oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ze względu na odchylenie od rozkładu normalnego w części badanych genów, analizę prowadzono za pomocą testów nieparametrycznych niewrażliwych na rozkład zmiennej. Ekspresję każdego genu w układzie tarczyca zdrowa–PTC porównywano za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa. Ekspresję wielu genów porównywano za pomocą testu Kruskala-Wallisa. We wszystkich analizach uwzględniono poprawkę na krotność porównań według Bonferroniego, kompensującą wpływ wielokrotnego powtarzania analiz statystycznych na zmienność wyniku. Za istotne statystycznie przyjęto różnice o poziomie istotności $p < 0,002$.

Wyniki

Ilościowa ocena ekspresji badanych genów

Dla każdego z badanych genów rezultatem analizy był raport przedstawiający surowe wyniki: wartość Ct oraz względną ilość matrycy odczytaną z krzywej standar-

Tabela II

Wartości względne odzwierciedlające ekspresję poszczególnych genów w nowotworowych i zdrowych tkankach tarczycy, uzyskane po znormalizowaniu wyników względem kontroli wewnętrznej

Table II

Relative expression of genes in tumor and normal tissues after normalization by internal control

KCNJ2	Mediana	Najniższa wartość	Najwyższa wartość	Średnia wartość	Odchylenie standardowe
Tkanka zdrowa	0,495	0,00001	15,359	1,049	2,876
PTC	3,430	0,00001	20,492	5,195	5,743
SLC34A2	Mediana	Najniższa wartość	Najwyższa wartość	Średnia wartość	Odchylenie standardowe
Tkanka zdrowa	0,053	0,0086	0,737	0,092	0,139
PTC	1,170	0,00001	6,721	1,811	1,626
SLC4A4	Mediana	Najniższa wartość	Najwyższa wartość	Średnia wartość	Odchylenie standardowe
Tkanka zdrowa	27,371	0,485	60,806	27,541	12,940
PTC	3,606	0,561	28,218	6,435	6,155

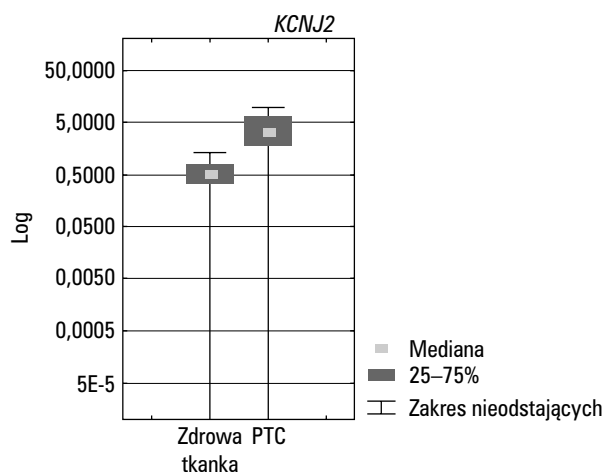
PTC (papillary thyroid carcinoma) — rak brodawkowaty tarczycy

dowej. Wartości ekspresji poszczególnych genów dla każdej badanej tkanki normalizowano względem kontroli wewnętrznej, jaką był gen β -glukoronidazy (*GUS*). Dzięki temu otrzymano względne wartości, umożliwiające dokonania porównań pomiędzy różnymi próbkami. Transkrypt dla genu *GUS* był obecny we wszystkich badanych tkankach, co dowodzi integralności RNA. Ekspresja genu *GUS* była stabilna w tkankach prawidłowych i w guzach, co potwierdzono testem Kruskala-Wallisa ($p = 0,321$, $n = 96$).

Zaobserwowano znaczne różnice w ekspresji badanych genów w analizowanych tkankach (tab. II). Najwyższy, bo aż 20-krotny, wzrost ekspresji wykazał gen *SLC34A2*. Znaczny wzrost ekspresji pomiędzy tkanką prawidłową a rakiem zaobserwowano również dla genu *KCNJ2*. Gen *SLC4A4*, kodujący kotransporter dwuwęglanu sodu, jako jedyny wykazał spadek ekspresji (7-krotny). Korzystając z testu Kruskala-Wallisa, porównano ekspresję każdego z genów między fragmentami zdrowej tarczycy a PTC (ryc. 1–3), stwierdzając znamienne różnicę ($p < 0,002$).

Dyskusja

Zmiany w ekspresji genów w PTC można interpretować w różnym kontekście: można sobie zadać pytanie, czy wzrost lub spadek ekspresji tego genu ma znaczenie dla diagnostyki danego raka lub też analizować znaczenie funkcjonalne obserwowanych zmian w ekspresji. W ostatnim czasie wiele badań koncentruje się na aspekcie diagnostycznym. Niestety, większość markerów zaproponowanych dla raka brodawkowatego [5] nie spełnia kryteriów markera idealnego. Dlatego też

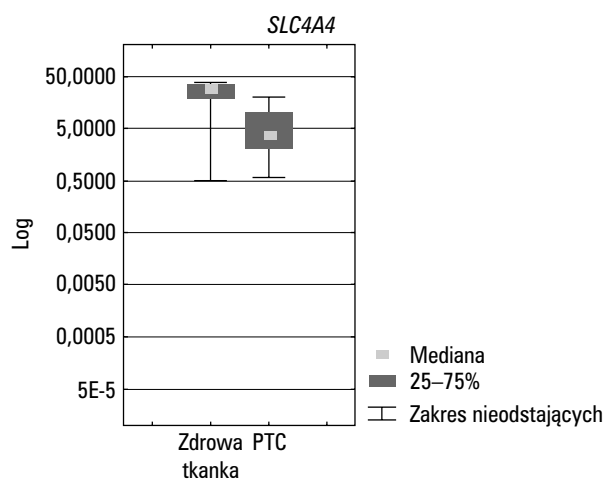


Rycina 1. Porównanie ekspresji genu *KCNJ2* w raku brodawkowatym tarczycy i zdrowym gruczole przy użyciu testu Kruskala-Wallisa. Różnica w ekspresji jest znamienne statystycznie ($p < 0,002$), PTC (papillary thyroid carcinoma) — rak brodawkowaty tarczycy

Figure 1. Comparison of *KCNJ2* expression in PTC (papillary thyroid carcinoma) and normal thyroid tissue samples (Kruskal-Wallis test). The difference between PTC and normal tissue is statistically significant

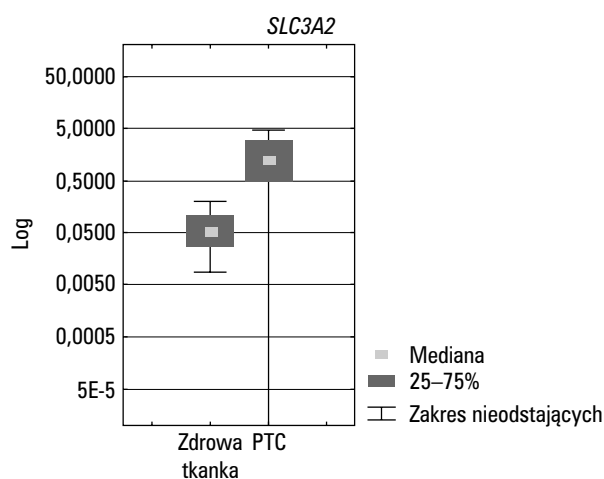
duży nacisk kładzie się ciągle na poszukiwanie nowych kandydatów na markery molekularne raka tarczycy.

W PTC pierwsze badania mikromacierzowe zostały przeprowadzone w 2001 roku w Ohio przez grupę prof. de la Chapelle z Columbus [5]. Wytypowanych zostało wówczas około 50 genów, z których część wykazywała nadekspresję w PTC, a pozostałe ulegały wyciszeniu. Geny te zostały dokładniej przeanalizowane w kolejnej publikacji pod kątem ich znaczenia w transformacji nowotworowej komórki pęcherzykowej tarczycy,



Rycina 2. Porównanie ekspresji genu *SLC4A4* w raku brodawkowatym tarczycy (PTC) i zdrowym gruczole przy użyciu testu Kruskala-Wallis. Różnica w ekspresji jest statystycznie istotna ($p < 0,002$)

Figure 2. Comparison of *SLC4A4* expression in PTC (papillary thyroid carcinoma) and normal thyroid tissue samples (Kruskal-Wallis test). The difference between PTC and normal tissue is statistically significant



Rycina 3. Porównanie ekspresji genu *SLC3A2* w raku brodawkowatym tarczycy (PTC) i zdrowym gruczole przy użyciu testu Kruskala-Wallis. Różnica w ekspresji jest statystycznie istotna ($p < 0,002$)

Figure 3. Comparison of *SLC3A2* expression in PTC (papillary thyroid carcinoma) and normal thyroid tissue samples (Kruskal-Wallis test). The difference between PTC and normal tissue is statistically significant

bowiem wiele z nich było po raz pierwszy związane z PTC [13]. Ekspresja 9 genów poddana była weryfikacji metodą RT-PCR i wykazała zgodność z wynikami uzyskanymi na mikromacierzach DNA. Nasze badania mikromacierzowe również udowodniły charakterystyczny profil ekspresji genów dla PTC [6], wykazujących znacznie zmienioną ekspresję w porównaniu z tkanką prawidłową tarczycy, i rozszerzono zbiór genów zaproponowany przez zespół z Ohio [5].

Spśród przeanalizowanych genów największe znaczenie diagnostyczne mógłby mieć gen *SLC34A2*, który wykazał znaczny (20-krotny) wzrost ekspresji. Gen *SLC34A2* koduje transporter anionów fosforanowych i bierze udział w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Nie opisano go dotychczas w raku tarczycy, stwierdzono natomiast, że wzrost jego ekspresji jest szczególnie charakterystyczny w raku jajnika [12]. Gen *KCNJ2*, kodujący transporter jonów potasowych, wykazywał kilkukrotny wzrost ekspresji w PTC w porównaniu ze zdrową tarczycą. W przypadku genu *SLC4A4*, należącego również do rodziny transporterów anionowych, zaobserwowano spadek ekspresji w PTC względem tarczycy zdrowych. Białko kodowane przez ten gen jest szczególnie charakterystyczne dla kanalików nerkowych bliższych, gdzie uczestniczy w filtracji i ponownym wchłanianiu HCO_3^{2-} .

Nasuwa się pytanie, czy zbadane przez nas geny mogą mieć znaczenie funkcjonalne w patogenezie PTC. Niestety, nie ukazała się dotychczas żadna praca opisująca mechanizmy regulujące ekspresję tych genów w nowotworach tarczycy. Można jedynie przypuszczać,

że geny *KCNJ2* i *SLC34A2*, wykazujące podwyższoną ekspresję w PTC, mogą podlegać podobnym mechanizmom regulacyjnym. W przypadku genów *SLC4A4* oraz *SLC34A2*, należących do rodziny transporterów anionowych, brak jest również jakichkolwiek doniesień z piśmiennictwa odnośnie ich ekspresji w prawidłowym gruczole, czy też tarczycy zmienionej nowotworowo. Najwięcej danych dotyczy ekspresji dwóch innych genów z tej rodziny: *NIS* (*SLC5A5*) i *PDS* (*SLC26A6*) [14]. Są to geny, które przyczyniają się do transportu jodków najpierw z krwi do cytoplazmy (*NIS*), a potem z cytoplazmy komórek pęcherzykowych do koloidu (*PDS*). Zaobserwowano wysoce znamiennej korelację pomiędzy ich ekspresją w raku tarczycy [14, 15]. Można zatem przypuszczać, że w przebiegu transformacji nowotworowej *NIS* i *PDS* podlegają wspólnemu mechanizmowi regulacyjnemu, powodującemu znaczne obniżenie ich ekspresji w porównaniu z tkanką prawidłową. W naszych badaniach zauważyliśmy, że znacznie obniżonej ekspresji genu *SLC4A4* towarzyszył wzrost ekspresji *SLC34A2*, nie obserwowaliśmy jednak żadnej korelacji z genem *NIS* (niemniej tę korelację porównywaliliśmy tylko na podstawie danych z mikromacierzy).

Wnioski

Wśród badanych genów najlepiej różnicującym PTC od zdrowej tarczycy okazał się gen *SLC34A2*. Konieczne są dalsze badania dla potwierdzenia jego znaczenia diagnostycznego.

Piśmiennictwo

1. Santaro M, Carlomagno F, Hay ID i wsp. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasm is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 1982; 89: 1517–1522.
2. Wiench M, Wloch J, Oczko M i wsp. Rearrangement of the RET gene in papillary thyroid carcinoma. *Wiad Lek* 2001; 54 (supl. 1): 64–71.
3. Jarzab B. Leczenie raka tarczycy. *Endokrynol Pol* 1995; 46: 25–35.
4. Cohen Y, Xing M, Mambo E i wsp. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003.
5. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ i wsp. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2001; 98 (26): 15044–15049.
6. Jarzab B, Wiench M, Fujarewicz K i wsp. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: Sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005; 65 (4): 1587–1597.
7. Lopes CM, Zhang H, Rohacs T i wsp. Alterations in conserved Kir channel-PIP(2) interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002; 34: 933–944.
8. Donaldson MR, Jensen JL, Tristani-Furouzi M i wsp. PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 2003; 60: 1811–1816.
9. Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC i wsp. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotype. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 663–668.
10. Soleimani M, Burnham CE. Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int* 2000; 57 (2): 371–384.
11. Igarashi T, Inatomi J, Sekine i wsp. Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nature Genet* 1999; 23: 264–265.
12. Feild JA, Zhang L, Brun KA i wsp. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258 (3): 578–582.
13. Prasad ML, Pellegata NS, Kloos RT i wsp. CITED1 protein expression suggests papillary thyroid carcinoma in high throughput tissue microarray-based study. *Thyroid* 2004; 14 (3): 169–175.
14. Bidart JM, Lacroix L, Evan-Brion D i wsp. Expression of Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4367–4372.
15. Arturi F, Russo D, Bidart JM i wsp. Expression pattern of the pendrin and sodium/iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 129–135.