

Génexpresszió-változások a mellékpajzsmirigy proliferatív folyamata során

Szende Béla¹, Árvai Kristóf¹, Peták István¹, Nagy Katalin¹,
Végső Gyula², Perner Ferenc²

¹Semmelweis Egyetem, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, MTA-SE EKSZ Molekuláris Patológiai Kutató Csoportja, ²Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinika, Budapest

Vizsgálatunk célja volt, hogy különböző proliferatív mellékpajzsmirigy-eltérések (hyperplasia, adenoma) fontosabb, apoptózissal kapcsolatos géneinek expressziós mintázatát tanulmányozzuk cDNS-microarray technikával, elősegítendő a normálistól (ép mellékpajzsmirigy) eltérő génkifejeződés esetleges diagnosztikus, ill. terápiás felhasználását. A felhasznált minták sebészi úton eltávolított, 2 hyperplasiát, 2 adenomát mutató és 2 ép mellékpajzsmirigyből származtak. Vizsgálatainkhoz a GEArray Q series Human Apoptosis Gene Array-t (Superarray) használtuk fel. Erre 112 gént nyomtattak, tetraspot elrendezésben, a próbák mérete 250-600 bázispár. Az elkészült array-re Streptavidint kötöttünk. A detektáláshoz CDP Star TM kemilumineszcens szubsztrátot használtunk. Az elemzés során a normális (kontroll) mellékpajzsmirigyekhez hasonlítottuk a hyperplasiás mellékpajzsmirigy, ill. a mellékpajzsmirigy-adenoma mintákat. Kimutattuk, hogy mind hyperplasiában, mind adenomában overexpresszáltak a CHEK1, ATM, BCL-XL, FAS, TNF, cIAP-1, TRAIL, FADD, CASP 4,5,6,8, CD120b, CD137, LTA, TANK, TARF2, CAD, LIGHTR, DR3LG, alulexpresszáltak a CASP1,10, BFAR, BOD, BCL2L2, TRANCE gének. Csak hyperplasiában overexpresszáltak gének: MDM2, MCL1, BCL2A1, BLK, RIPK2, CD40LG, TRAF5, HUS1, BNIP3. Csak hyperplasiában alulexpresszáltak: BOK, CIDEA, TRAF1, TRIP gének. Csak az adenomák overexpresszálták az APOLLON, RIPK1, LTB, LTBR, CASP2,13, cIAP2, CIDEB géneket, alulexpresszálták a TRAF4-et és a FASLG-t. Overexpresszióról, ill. alulexpresszióról akkor szövelünk, ha a vizsgált minták átlagértéke legalább másfélszer több, vagy másfélszer kevesebb a normális átlagértéknél. Eredménynek tekintjük, hogy a mellékpajzsmirigy-hyperplasiában és -adenomában azonosítottunk sejtciklust szabályozó géneket, anti-apoptotikus és néhány pro-apoptotikus gént is. A megnövekedett proliferációval együtt jár az apoptotikus aktivitás növekedése is, azonban a tumorsejtek képesek ezt túlélni, anti-apoptotikus gének overexpresszióját okozó szignálutvonalak aktiválásával. *Magyar Onkológia 50:137-140, 2006*

The aim of this study was to investigate the changes in expression pattern of the most important genes connected with apoptosis in proliferative apoptotic lesions (hyperplasia, adenoma), applying cDNA microarray technique, in order to promote the possible diagnostic or therapeutic utilisation of any difference in gene expression compared to the healthy (normal) parathyroid gland. Samples were taken from surgically removed 2 hyperplasias, 2 adenomas and 2 normal parathyroid glands. The Apoptosis Gene Array (Superarray) was used. This contains 112 genes, in tetraspot arrangement. The probes measured 250-600 base pairs. Streptavidin was bound to the array. CDP Star TM chemiluminescent substrate was used for detection. The samples deriving from hyperplasia or adenoma were compared to samples from normal parathyroid glands. The following genes were overexpressed in both hyperplasia and adenoma: CHEK1, ATM, BCL-XL, FAS, TNF, cIAP1, TRAIL, FADD, CASP 4,5,6,8, CD120b, CD137, LTA, TANK, TARF2, CAD, LIGHTR, DR3LG. CASP1,10, BFAR, BOD, BCL2L2, TRANCE were underexpressed in both hyperplasia and adenoma. Genes overexpressed only in hyperplasia were: MDM2, MCL1, BCL2A1, BLK, RIPK2, CD40LG, TRAF5, HUS1, BNIP3. Underexpressed only in hyperplasia: BOK, CIDEA, TRAF1, TRIP. Overexpressed only in adenoma: APOLLON, RIPK1, LTB, LTBR, CASP2,13, cIAP2, CIDEB. Underexpressed only in adenoma: TRAF4 and FASLG. Overexpression or underexpression meant 1.5-fold difference from normal average values. As a result of this study, both pro-apoptotic and anti-apoptotic genes were identified in hyperplasia and adenoma of the parathyroid gland. It seems that increased proliferation is connected also with increased apoptotic activity, but tumor cell candidates are able to survive, by activation of signal pathways resulting in overexpression of anti-apoptotic genes. *Szende B, Árvai K, Peták I, Nagy K, Végső G, Perner F. Changes in gene expression during the proliferative processes of parathyroid gland. Hungarian Oncology 50:137-140, 2006*

Közlésre érkezett: 2006. május 16.
Elfogadva: 2006. május 24.

Levelezési cím: Dr. Szende Béla, SE. I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út. 26. E-mail: bszende@korbl.sote.hu

Bevezetés

A mellékpajzsmirigy (mpm) sejtproliferációval járó folyamatai közül a hyperplasia a leggyakoribb. Ez az elváltozás az esetek többségében idővel veseelegtelenység következtében lép fel, és funkcionálisan ún. secundaer hyperparathyreosissal jár (5). Valamivel ritkább a primaer parathyreo-

sist okozó mpm-adenoma (6). Kivételesen ritka azonban a mpm klinikailag és patológiai vizsgálatokkal is egyértelműen igazolt rákja (3).

Feltehető, hogy a mpm proliferatív folyamatai során a proliferáló sejtekben olyan sajátos génexpressziós profil alakul ki, amely a sejtszaporodás és sejthalál egyensúlyának felbomlását csak egy bizonyos pontig teszi lehetővé. Korábbi vizsgálataink nyomán azt találtuk, hogy mind a mpm-hyperplasiát, mind az adenomát képező sejtekben kimutatható a pro-apoptotikus bax és az anti-apoptotikus bcl2, míg mpm-carcinomában a citoplazmában a bax- és bcl2-pozitivitás eltűnik, miközben a sejtmagban p53-pozitivitás jelenik meg immunhisztokémiailag (8).

Újabb, prospektív tanulmányunk célja volt, hogy mpm-hyperplasia és -adenoma sejteji fontosabb, apoptózissal és sejtproliferációval kapcsolatos géneinek expressziós mintázatát tanulmányozzuk cDNS-microarray technikával, elősegítendő a normálistól (ép mpm) eltérő génkifejeződés esetleges diagnosztikus, ill. terápiás felhasználását.

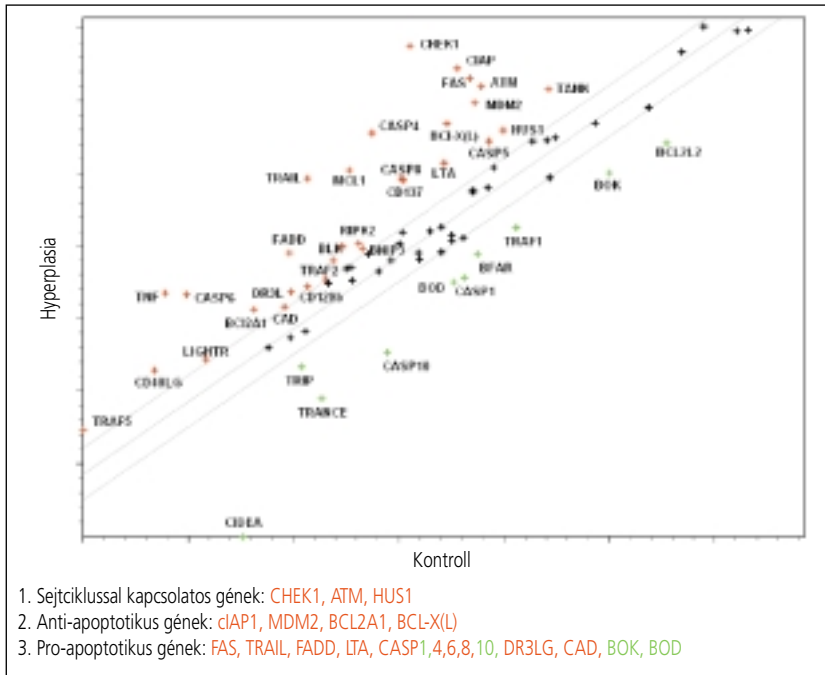
Anyag és módszer

A felhasznált minták sebészi úton eltávolított 2 hyperplasiát, 2 adenomát mutató és 2 ép mpm-ből származtak, melyeket -192°C -on folyékony-nitrogén-tartályban, fagyasztóampullában tároltunk a feldolgozásig.

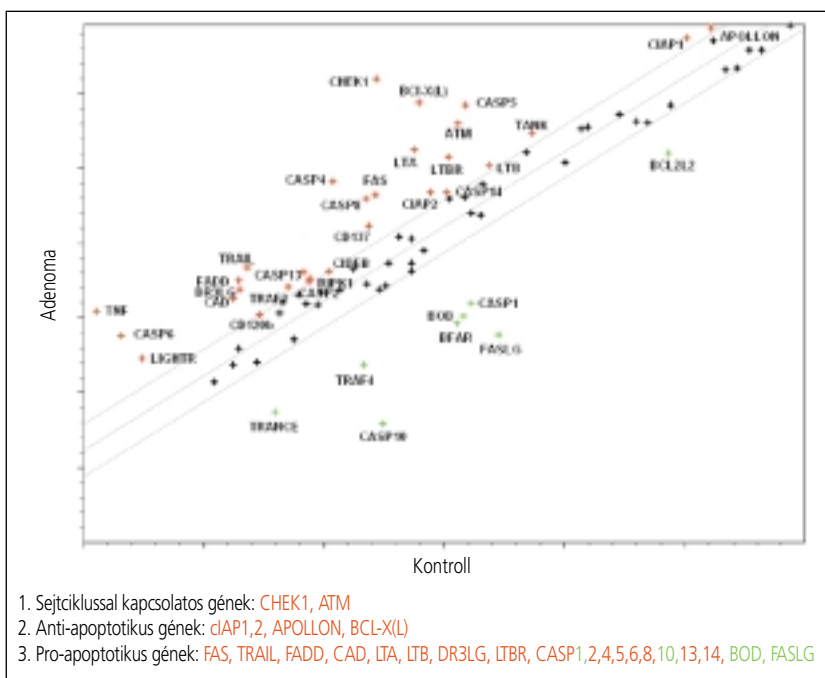
A molekuláris patológiai vizsgálathoz a GEArray Q series Human Apoptosis Gene Array-t (Superarray) használtuk. Erre 112 gént nyomtatnak, négy pontos (tetraspos) elrendezésben. A próbák mérete 250-600 bázispár, ami specifikus kötődést tesz lehetővé, maximalizálja a szenzitivitást és kizárja a kereszthibridizációt. A próbaszintézist lineáris polimeráz reakcióval (LPR) végeztük el. Első lépésben az izolált RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk. Ezután hagyományos PCR-reakciót végeztünk, a cDNS-hez hozzáadtunk egy olyan specifikus primer-keveréket, mely mindegyik vizsgált génre tartalmaz primer-párt. A reakcióhoz adtunk biotin-16-dUTP-t, így az elkészült próba biotinilált lett. A próbát denaturáltuk, a membránra történő hibridizálás egy éjszakán át tartott. Az elkészült arrayre enzimmel kapcsolt streptavidint kötöttünk. A detektáláshoz CDPStar TM kemilumineszcens szubsztrátot használtunk. Az elemzés során három összehasonlítást végeztünk: a normális (kontroll) mpm-ekhez hasonlítottuk a hyperplasiás mpm, ill. a mpm-adenoma mintákat, továbbá összehasonlítottuk egymással a mpm-hyperplasia és -adenoma mintákat is. Overexpressziót, ill. alulexpressziót akkor állapítottunk meg, ha a vizsgált minták átlagértéke legalább másfélszer több, vagy másfélszer kevesebb volt a normális átlagértéknél.

Az elkészült array-k validációját real-time PCR módszerrel végeztük, SYBR GREEN (Applied Biosystem) használatával. A PCR-reakcióhoz adott SYBR GREEN interkalálódik a két-szállú DNS-be és fluoreszcens jelet ad. A ciklus

1. ábra. Hyperplasiát mutató és normális mpm génexpressziós mintázatának összehasonlítása. Fekete kereszt: 1,5x-nél kisebb expressziós különbség; piros kereszt: 1,5x-nél nagyobb expressziónövekedés; zöld kereszt: 1,5x-nél nagyobb expressziócsökkenés. A középvonaltól való távolság arányos az expressziós különbséggel.



2. ábra. Mpm-adenoma és normális mpm génexpressziós mintázatának összehasonlítása



kezdetekor a SYBR GREEN szabad formában van jelen, a hőmérséklet csökkenésével és a primer-kötődésével párhuzamosan kötődik be a festék és ad egy alacsony intenzitású jelet. Az elongációnál a festék gyorsan interkalálódik a keletkező termékbe és erős jelet ad, majd a ciklus végén újra szabad formába kerül a hőmérséklet emelkedésével. A fluoreszcencia arányos a reakciótermék mennyiségével, így a reakció mennyiségileg meghatározható. Ezzel a módszerrel az APOLLON génre vonatkozó vizsgálatot végeztünk.

Eredmények

- Találtunk olyan géneket, amelyek mind hyperplasiában, mind adenomában overexpresszáltak. Ezek: CHEK1, ATM, BCL-XL, FAS, TNF, cIAP1, TRAIL, FADD, CASP 4,5,6,8, CD120b, CD137, LTA, TANK, TARF2, CAD, LIGHTR, DR3LG.
- Mind hyperplasiában, mind adenomában alulexpresszáltak a CASP 1,10, BFAR, BOD, BCL2L2, TRANCE gének.
- Csak hyperplasiában overexpresszált gének: MDM2, MCL1, BCL2A1, BLK, RIPK2, CD40LG, TRAF5, HUS1, BNIP3.
- Csak hyperplasiában alulexpresszált gének: BOK, CIDEA, TRAF1, TRIP.
- Csak adenomában overexpresszált gének: APOLLON, RIPK1, LTB, LTBR, CASP 2,13, cIAP2, CIDEB.
- Csak adenomában alulexpresszált gének: TRAF4 és FASLG.

A fentieket és az expressziókat a kontrollhoz viszonyított mértékét mutatja az 1-3. ábra.

Real-time PCR vizsgálattal kimutattuk, hogy az APOLLON génre vonatkozó görbe a kontrollhoz viszonyítva 7 ciklussal hamarabb indul el, vagyis adenomában az APOLLON mennyisége a normális többszöröse (4. ábra).

Megbeszélés

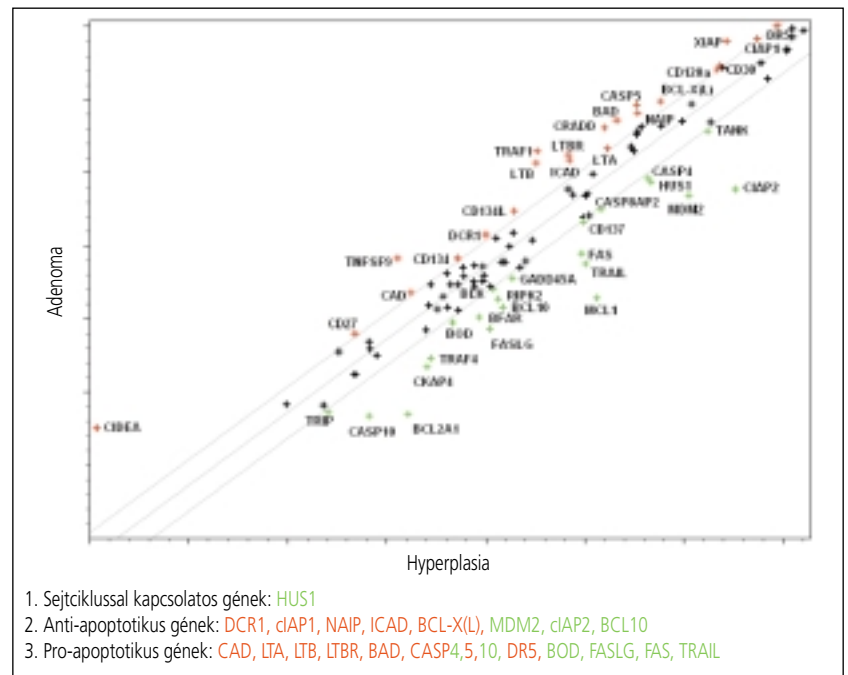
Tíz éves műtéti anyagunkban 54 mpm-hyperplasia, 50 mpm-adenoma és egyetlen mpm-carcinoma fordult elő (8). Ez a tény is alátámasztja, hogy ebben a szervben ritkaságszámba megy a malignus átalakulás. Általánosan elfogadhatónak tekinthető, hogy a daganatos progresszió során az anti-apoptotikus gének fokozott kifejeződése és a pro-apoptotikus gének csökkent mértékű kifejeződése következik be (4). Ez a jelenség nemcsak a carcinomára, hanem a jóindulatú proliferatív folyamatokra is érvényes. Vizsgálatunk során a mpm-hyperplasiában és -adenomában azonosítani tudtunk sejtciklust szabályozó géneket, anti-apoptotikus és pro-apoptotikus géneket egyaránt. Figyelemre méltó, hogy mind hyperplasiában, mind adenomában overexpresszáltak a CHEK1, az ATM, a BCLXL és a cIAP-1 anti-apoptotikus gének és a FAS, TRAIL, FADD pro-apoptotikus gének. Az apoptózis szabályozásában fontos szerepet játszó MDM-2 antiapoptotikus gén viszont

csak a hyperplasia esetében mutatott fokozott kifejeződést, míg egy másik jelentős anti-apoptotikus gén, az APOLLON, csak az adenomában overexpresszált, amit real-time PCR-rel is igazolni tudtunk. A fenti két gén meghatározása kétes esetekben még a két proliferatív folyamat elkülönítésében is segítségünkre lehet.

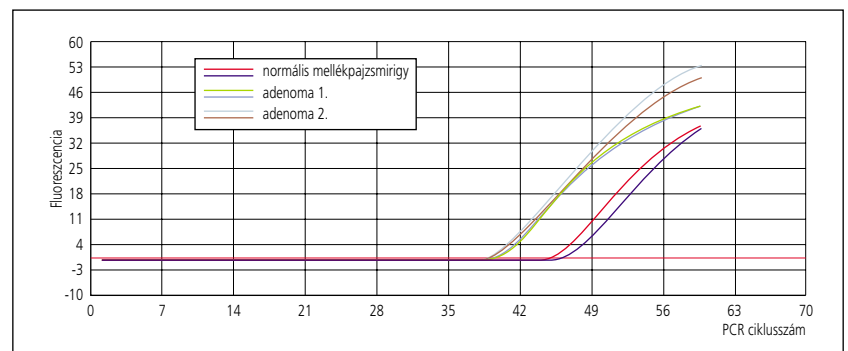
Anyagunkból sajnos hiányzik a mpm-carcinoma sejtproliferációs és apoptózist szabályozó génjeinek molekuláris patológiai szinten történő meghatározása. Ennek oka, hogy a mpm-carcinoma ritka előfordulása miatt molekuláris vizsgálatra alkalmas anyaghoz nem jutottunk hozzá. A rendelkezésre álló mpm-hyperplasia és mpm-adenoma minták vizsgálata alapján – meg erősítve a magunk és mások korábbi, immunhisztokémiai tanulmányok során elért eredményeit (1, 2, 7-9) – azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a megnövekedett proliferációval együtt jár a pro-apoptotikus aktivitás növekedése is, azonban a sejtek nagyobb hányada képes ezt túlélni, anti-apoptotikus gének fokozott kifejeződését okozó jelátvivő útvonalak aktiválódásával.

3. ábra.

Mpm-adenoma és hyperplasiát mutató mpm génextpressziós mintázatának összehasonlítása



4. ábra. Az APOLLON gén mennyiségi meghatározása mpm-adenomában és normális mpm-ben real-time PCR módszerrel. Adenomában 7 ciklussal hamarabb indul el a görbe, mint a normális mintában, vagyis adenomában többszörös az APOLLON mennyisége a normálishoz képest, ahogy ezt az array-vizsgálat is jelezte.



Irodalom

1. Erikson LA, Jin L, Wollan P, et al. Parathyroid hyperplasia, adenomas and carcinomas: Differential expression of P27 protein. *Am J Surg Pathol* 23:288-295,1999
2. Hadar T, Shvero J, Yaniv E, et al. Expression of P53, Ki67 and Bcl2 in parathyroid adenoma and residual normal tissue. *Pathol Oncol Res* 11:45-49, 2005
3. Koea JB, Shaw JH. Parathyroid cancer. Biology and management. *Surg Oncol* 8:155-165,1999
4. Kopper L. A sejtproliferáció és az apoptózis. In. Apoptózis, Eds. Kopper L, Fésüs, L. Medicina, Budapest, 2002, pp. 181-205
5. Reiss E, Counterbury IM. Spectrum of hyperparathyroidism. *Am J Med* 56:784-810,1974
6. Roth SJ. The parathyroid gland. In: Silverberg SG: *Principals and Practice of Surgical Pathology*. Second Edition. Churchill Livingstone, New York, 1990, pp. 1923-1955
7. Stojadinovic A, Hoos A, Nissan A, et al. Parathyroid neoplasms. Clinical, histopathological and tissue-microarray-based molecular analysis. *Hum Pathol* 34:54-64, 2003
8. Szende B, Farid P, Végső G, Perner F. Apoptosis and P53, Bcl2 and Bax gene expression in parathyroid glands of patients with hyperparathyroidism. *Pathol Oncol Res* 10:98-103, 2004
9. Vargas MP, Vargas HI, Kleiner DE, et al. The role of prognostic markers (MIB-1, RB and Bcl2) in the diagnosis of parathyroid tumors. *Mod Pathol* 10:12-17,1997