

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

SYNTECKÝ MULTILOKUSOVÝ KALIBRÁTOR PRO STUDIUM GENOVÉ EXPRESY V NÁDORECH HYPOFÝZY VYVOLÁVAJÍCÍCH AKROMEALII

MARTIN BERÁNEK^{a,b}, MONIKA DRASTÍKOVÁ^a,
FILIP GABALEC^c, VLADIMÍR PALÍČKA^a
a JAN ČÁP^c

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta
Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové,
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, ^b Katedra biochemie
a farmaceutické fakulta v Hradci Králové, Uni-
verzita Karlova v Praze, ^c 4. Interní hematologická klinika,
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice
Hradec Králové
beranek@lfhk.cuni.cz

Došlo 7.6.15, přijato 26.6.15.

Klíčová slova: kalibrátor, genová syntéza, receptor,
hypofýza, akromegalie, exprese

Úvod

Analýza exprese genu nebo skupiny vytipovaných genů slouží v současné medicíně nejen k diagnostickým účelům, ale též k určení vhodného terapeutického postupu a ke kontrole úspěšnosti léčby. Příkladem může být sledování počtu fúzních transkriptů BCR-ABL v krvi pacientů s chronickou myeloidní leukémií¹, vyšetření inzulinových hybridních receptorů u diabetiků² či určení exprese estrogenových receptorů u žen s diagnostikovaným nádorem prsní žlázy³.

V posledních deseti letech došlo k rozvoji nových skupin léčiv, jejichž struktura je odvozena od hormonů a neurotransmiterů přítomných v lidském organismu. Rozšíření této tzv. cílené biologické léčby znásobilo počty klinických požadavků na analýzu exprese tkáňových receptorů, na které se podaná léčiva váží. Získaný výsledek vyšetření podmiňuje správnost indikace této nákladné léčby pro konkrétního pacienta.

Cílená terapie se využívá také u nádorů hypofýzy⁴. Mezi podávaná léčiva patří somatostatinová analoga (oktreotid, lanreotid, pasireotid), agonisté dopaminu (kabergolin, bromokriptin) a estrogenové modulatory (raloxifen). Dopaminergní agonisté jsou léky první volby u prolaktinomů, tj. adenomů hypofýzy sekretujících hormon prolaktin. U adenomů produkujících růstový hormon, adrenokortikotropní hormon či tyreotropin, a též u klinicky

afunkčních adenomů, může cílená léčba sloužit ke zmenšení nádorového ložiska před jeho chirurgickým odstraněním. Znalost exprese somatostatinových receptorů 1–5 (SSTR1–SSTR5), dopaminového receptoru typu 2 (D2R) a estrogenového receptoru (ER1) v odoperované tkáni představuje možnost, jak pomocí vhodně zvolené farmakoterapie snížit riziko nádorových recidiv⁵.

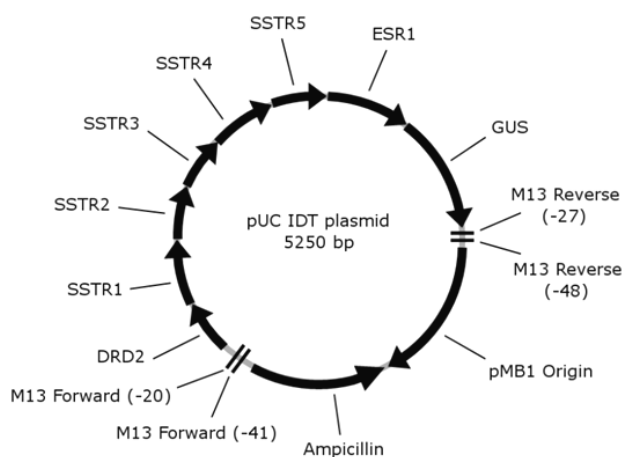
Vyšetření exprese receptorů v resekované tkáni lze provést pomocí autoradiografických a imunohistochemických vyšetření^{6,7}. Alternativní metodou je určení míry transkripce genů pro příslušné receptory. V současnosti se pro tyto účely nejčastěji používá postup zahrnující reverzní transkripci a PCR provedenou v reálném čase, real-time PCR⁸. Výsledek vyšetření se kvůli nestabilitě molekul mRNA normalizuje na množství transkriptů referenčních genů přítomných ve vzorku a vyjadřuje se bezrozměrně. Pokud se hodnotí exprese několika genů současně, a pokud používané reakce nemají stejnou amplifikační účinnost, je pro spolehlivou kvantitativní analýzu nutné provést kalibrace všech používaných metod. Potřebný kalibrační materiál se získává molekulovým klonováním⁹; počty kopií genů obsažené v kalibrátorech se odhadují spektrofotometricky. Nejistota těchto odhadů přispívá k variabilitě výsledků exprese studovaných receptorů.

Cílem této studie bylo navrhnout unikátní multilokusový kalibrátor obsahující specifické sekvence genů *SSTR1–SSTR5*, *D2R*, *ER1* a referenčního genu pro glukuronidasu (*GUS*). K přípravě multikalibrátorů byly použity metody genové syntézy a skládání segmentů DNA do jednoho řetězce^{10,11}. Vyšetřený soubor vzorků zahrnoval adenomy hypofýzy s nadprodukcí somatotropního hormonu vyvolávajícího příznaky akromegalie. Incidence tohoto nádorového onemocnění v ČR je 20–40 případů ročně.

Experimentální část

Příprava syntetických multikalibrátorů

Struktura polynukleotidového řetězce kalibrátorů se skládala z osmi syntetických segmentů (IDT, USA), jejichž řazení bylo následující: *D2R* (segment I; 150 bp; přístupový kód v NCBI databázi NM_000795.3; pozice 1281–1430), *SSTR1* (segment II; 210 bp; NM_001049.2; pozice 1891–2100), *SSTR2* (segment III; 140 bp; NM_001050.2; pozice 279–418), *SSTR3* (segment IV; 140 bp; NM_001051.4; pozice 724–863), *SSTR4* (segment V; 240 bp; NM_001052.2; pozice 1–240), *SSTR5* (segment VI; 142 bp; NM_001053.3; pozice 1013–1154), *ER1* (segment VII; 307 bp; NM_000125.3; pozice 954–1260) a *GUS* (segment VIII; 487 bp; NM_000181.3; pozice 1708–2194). Celý řetězec o délce 1816 bp (obr. 1) byl jako inzert použit pro molekulové klonování, jehož detaily jsme po-



Obr. 1. Pořadí syntetických genových segmentů v klonovacím vektoru pUC IDT

psali dříve¹². Ze získaných molekul DNA byla pomocí ředící řady vytvořena série multikalibračních vzorků s koncentrací 10^6 – 10^1 kopií/μl. Při každé kalibraci byl daný standard použit vždy dvakrát.

Soubor vyšetřených vzorků

Soubor osob byl složen z 22 mužů a 22 žen s mediánem věku 51 roků (rozsah 26–76 roků). Všichni byli indikováni k operaci pro diagnózu akromegalie způsobenou nadměrnou sekrecí růstového hormonu a následně inzulínu podobnému růstového faktoru I. Ve studii byly použity vzorky 44 adenomů získané při jejich resekci. Velikost nádorů určená zobrazovacími technikami se pohybovala od jednoho do čtyř centimetrů. Studie byla schválena etikou komisí a pacienti před operací podepsali informovaný souhlas.

Extrakce RNA a reverzní transkripce

Část resekovaného nádoru byla ihned po vyoperování vložena do zkumavky se stabilizačním roztokem RNeasy Lysis Reagent (Qiagen, SRN) a uchovávána při teplotě -80°C . Izolace RNA byla provedena s použitím roztoku Trizol Reagent (Invitrogen, USA). Po izolaci proběhla inkubace extraktu s DNase I (Roche Diagnostics, SRN) při 30°C po dobu 20 min. Koncentrace a čistota extraktů byly určeny pomocí UV spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Pro reverzní transkripci byla použita souprava SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA).

Real-time PCR

Reakční směs o objemu 25 μl obsahovala 12,5 μl komerční směsi TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), oba primery o koncentraci 300 nmol l^{-1} , hydrolytickou sondu o koncentraci 200 nmol l^{-1}

a 5 μl cDNA. Sekvence primerů a sond pro *SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3* a *SSTR5* byly získány z literatury¹³. Přímý primer pro *D2R* receptor měl strukturu 5'-CAA GAC CAT GAG CCG TAG GAA G -3', zpětný primer 5'-TGT GTG TGA TGA AGA AGG GCA G -3' a sonda 5'-FAM-CCC AGC AGA AGG AGA AGA AAG CCA CTC A-TAMRA -3'. Pro analýzu *SSTR4* a *ER1* jsme použili komerční soupravy Taqman Gene Expression Assay Hs01566620_s1 a Taqman Gene Expression Assay Hs00174860_m1 (Invitrogen, USA). Množství transkriptů *GUS* bylo stanoveno soupravou Ipsogen BCR-ABL1 Mbc (GUS) Kit (Qiagen, SRN). Real-time PCR byla provedena v přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Austrálie). Teplotní podmínky zahrnovaly teploty při 50°C po dobu 2 min a 95°C 10 min. Následovalo 50 cyklů složených z 15s denaturace při 95°C a 60s hybridizace a polymerace při 60°C . Získaná data byla normalizována na počet transkriptů *GUS*; všechny vzorky byly vyšetřeny v dubletu.

Statistická analýza

Pro statistiku byly využity programy Statistica v.12 (StatSoft, ČR) a MedCalc (MedCalc Software, Belgie). Hodnocení významnosti změn mezi soubory dat bylo provedeno pomocí neparametrického Mann-Whitneyova U testu. Za statisticky významné byly považovány změny při hodnotě $P < 0,05$.

Výsledky a diskuse

Syntézou a spojením všech navržených genových segmentů do jediného inzertu se zajistilo jejich ekvimolární zastoupení v připravených syntetických multikalibračních roztocích. Rovnocennost kalibračních bodů pro jakýkoliv sledovaný receptor, včetně genu *GUS*, byla patrná ze získaných kalibračních parametrů. V tab. I jsou pro každý kalibrační bod uvedeny počty cyklů PCR nezbytné k překonání meze detekce (CT, cycle threshold). Jako mez detekce byla pro všechny metody zvolena hodnota 0,05 fluorescenčních jednotek.

Tabulka I

Hodnoty CT zjištěné v kalibračních standardech

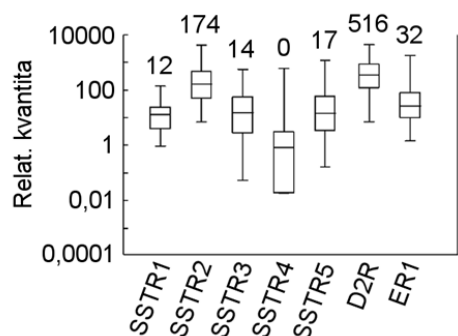
Gen	Počty kopií v kalibračním standardu				
	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$
<i>SSTR1</i>	19,4	22,6	26,1	29,5	33,0
<i>SSTR2</i>	20,4	23,6	26,9	30	33,8
<i>SSTR3</i>	17,6	20,7	23,9	27,3	31,1
<i>SSTR4</i>	18,6	21,9	25,3	28,7	32,2
<i>SSTR5</i>	18,4	21,9	25,4	28,8	32,5
<i>D2DR</i>	19,5	22,8	26,2	29,9	33,2
<i>ER1</i>	17,5	20,9	24,2	27,9	31,3
<i>GUS</i>	18,1	21,7	25,4	29,0	32,7

Z tab. I je patrné, že hodnoty CT se pro jednotlivé receptory nelišily o více než 2–3 reakční cykly. Tyto rozdíly byly způsobeny různou reakční kinetikou jednotlivých metod. Rozmezí směrnice kalibračních funkcí obecného tvaru $CT = \text{směrnice} \cdot \log(\text{koncentrace}) + \text{konstanta}$ bylo –3,38 až –3,53; účinnost reakcí kolísala mezi 1,9 a 2,0.

Vyšetření transkriptů *SSTR1–SSTR3*, *D2R* a *ER1* prokázalo jejich expresi ve všech 44 adenomech. Expres *SSTR5* byla potvrzena ve 34 případech (77 %) a *SSTR4* v 31 adenomu (70 %). Transkripty genu *GUS* byly ve vzorcích přítomny v množství od 1816 do 48 464 kopií (medián 12 812 kopií). Na obr. 2 jsou v logaritmickém znázornění vyneseny exprese všech sedmi studovaných receptorů. Hodnoty mediánů jsou uvedeny nad jednotlivými krabicovými grafy.

Nejvyšší počty transkriptů byly nalezeny v genech *SSTR2* a *D2R*, které se významně ($P < 0,001$) lišily od genů se středně vysokou expresí (*SSTR1*, *SSTR3*, *SSTR5* a *ER1*). Prokazatelně nejnižší expresi měl gen *SSTR4* ($P < 0,001$). Podobné výsledky získané s menšími počty vyšetřených osob byly publikovány již dříve^{14,15}. Hodnoty exprese *SSTR2* a *D2R* v našem souboru spolu vzájemně korelovaly ($r = 0,33$; $P < 0,026$).

Relativně vysoké exprese *SSTR2* umožňují použít k léčbě akromegalie somatostatinová analoga (oktreotid nebo lanreotid). Tato dlouhodobě působící léčiva snižují sekreci růstového hormonu u neoperabilních pacientů, usnadňují překlenutí období před nástupem účinku radioterapie, a jsou využívány také v předoperačním období. Úspěšnost této léčby bývá až 70 % a souvisí s mírou exprese *SSTR2* (cit.¹⁶). U rezistentních pacientů lze vzhledem k vysokým hladinám receptorů *D2R* použít v kombinaci dopaminové agonisty¹⁷. Léčbu je možno také kombinovat s radioterapií, a nově též s antagonistou růstového hormonu působícím na receptorech pro růstový hormon (pegvisomant).



Obr. 2. Expresní profil somatostatinových receptorů (*SSTR1–SSTR5*), dopaminového receptoru (*D2R*) a estrogenového receptoru (*ER1*)

Dosavadní studie nepotvrdily korelaci mezi imunochemicky stanovenými počty receptorů a množstvím transkriptů určených pomocí real-time PCR (cit.¹⁸). Vzájemný nesoulad výsledků obou metod může souviset s regulačními procesy ovlivňujícími posttranslačně počet receptorů, s heterodimerizací receptorů v membráně či internalizací receptorů do cytosolu buněk; vliv mohou mít různé sestřihové varianty mRNA a další faktory. Nejvhodnější metodický postup analýzy těchto receptorů bude možné vybrat až po zveřejnění výsledků dlouhodobějšího sledování většího počtu léčených osob. Tato data zatím nejsou k dispozici.

Závěr

Vytvořené multilokusové kalibrátory jsou nástrojem pro získání spolehlivých výsledků stanovení množství transkriptů somatostatinových, dopaminových a estrogenových receptorů. Určení jejich expresního profilu v odoperované tkáni může přispět k volbě správné strategie péče o pacienty s adenomy hypofýzy.

Tato studie byla finančně podpořena prostředky MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906), grantem SVV 260057/2014 a projektem PRVOUK P37/11 Univerzity Karlovy v Praze.

LITERATURA

- Ross D. M., Branford S., Seymour J. F., Schwarzer A. P., Arthur C., Bartley P. A., Slader C., Field C., Dang P., Filshie R. J., Mills A. K., Grigg A. P., Melo J. V., Hughes T. P.: *Leukemia* 24, 1719 (2010).
- Sesti G., Federici M., Lauro D., Sbraccia P., Lauro R.: *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17, 363 (2001).
- Tramm T., Hennig G., Kyndi M., Alsner J., Sørensen F. B., Myhre S., Sørli T., Overgaard J.: *Virchows Arch.* 463, 775 (2013).
- Colao A., Pivonello R., Di Somma C., Savastano S., Grasso L. F., Lombardi G.: *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 10, 111 (2009).
- Hofland L. J., Feelders R. A., de Herder W. W., Lamberts S. W.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 326, 89 (2010).
- Visser-Wisselaar H. A., Van Uffelen C. J., Van Koetsveld P. M., Lichtenauer-Kaligis E. G., Waaijers A. M., Uitterlinden P., Mooy D. M., Lamberts S. W., Hofland L. J.: *Endocrinology* 138, 1180 (1997).
- Korner M., Waser B., Schonbrunn A., Perren A., Reubi J. C.: *Am. J. Surg. Pathol.* 36, 242 (2012).
- Nishioka H., Tamura K., Iida H., Kutsukake M., Endo A., Ikeda Y., Haraoka J.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 331, 73 (2011).
- Muscarella L. A., D'Alessandro V., la Torre A., Coppetti M., De Cata A., Parrella P., Sperandeo M., Pellegrini F., Frusciante V., Maiello E., Merla G., Fazio V. M., Vendemiale G.: *Cell. Oncol.* 34, 435 (2011).
- Hughes R. A., Miklos A. E., Ellington A. D.: *Methods Enzymol.* 498, 277 (2011).

11. Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O.: *Nat. Methods* 6, 343 (2009).
12. Beránek M., Drastíková M., Sirák I., Paulíková S., Vošmik M., Petera J.: *Chem. Listy* 107, 880 (2013).
13. O'Toole D., Saveanu A., Couvelard A., Gunz G., Enjalbert A., Jaquet P., Ruzsiewicz P., Barlier A.: *Eur. J. Endocrinol.* 155, 849 (2006).
14. Taboada G. F., Luque R. M., Bastos W., Guimaraes R. F., Marcondes J. B., Chimelli L. M., Fontes R., Mata P. J., Filho P. N., Carvalho D. P., Kineman R. D., Gadelha M. R.: *Eur. J. Endocrinol.* 156, 65 (2007).
15. Nielsen S., Møller S., Rasmussen L. M., Ledet T., Olsen N., Bojsen-Møller M., Astrup J., Weeke J., Jørgensen J. O.: *J. Endocrinol. Invest.* 24, 430 (2001).
16. Colao A., Auriemma R. S., Lombardi G., Pivonello R.: *Endocr. Rev.* 32, 247 (2011).
17. Colao A.: *Endokrynol. Pol.* 58, 356 (2007).
18. Gonzalez B., Vargas G., Ramirez C., Asa S., Cheng S., Sandoval C., Mercado M.: *Endocrinol. Nutr.* 61, 523 (2014).

M. Beránek^{a,b}, M. Drastíková^a, F. Gabalec^c, V. Palička^a, and J. Čáp^c (^a *Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital, Hradec Králové*, ^b *Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Charles University in Prague*, ^c *Department of Internal Medicine 4, Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital, Hradec Králové*): **A Synthetic Multilocus Calibrator for Analysis of Gene Expression in Pituitary Tumors Causing Acromegaly**

The aim of the study was to propose a multilocus calibrator containing seven specific sequences of *SSTR1-SSTR5*, *D2R*, *ER1* genes and the *GUS* house-keeping reference gene. For preparation, gene synthesis and gene assembly technique were used. The experimental group consisted of 44 pituitary adenomas with overproduction of growth hormone leading to acromegaly. The gene expression was investigated using the real-time PCR. We revealed highest numbers of *SSTR2* and *D2R* transcripts, lower numbers of *SSTR1*, *SSTR3*, *SSTR5* and *ER1* transcripts, and the lowest transcription of the *SSTR4* gene. The use of the multicalibrator ensured a high comparability of the results obtained for the tested genes.