

VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR VYBRANÝCH GENŮ U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

REAL-TIME PCR FOR QUANTIFICATION OF EXPRESSION OF CRITICAL GENES IN MULTIPLE MYELOMA

DUDOVÁ S.¹, HÁJEK R.^{1,2,3}

¹ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Real-time PCR je metoda, která se používá pro sledování hromadění produktů polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Je schopna detekovat již minimální množství nukleových kyselin s vysokou přesností a citlivostí. Tato technika se v laboratorii uplatňuje jak při stanovení diagnózy, tak ve výzkumu. V diagnostice umožňuje kvantitativní PCR detekci genů, které se hrají roli v rozvoji infekčního onemocnění, nádorů a genetických abnormalit. Ve výzkumu umožňuje metoda vysoce citlivé kvantitativní měření genové transkripce. V laboratorii může být použita pro stanovení změn genové exprese určitého genu v čase jako odpověď buněk po podání léku, v diferenciaci buněk nebo jako reakce na změnu podmínek prostředí. Tato práce se zaměřuje na využití real-time PCR při studiu mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: real-time PCR, kvantitativní PCR, mnohočetný myelom, genová exprese.

Summary

Real-time PCR is a method used to monitor the amplification of polymerase chain reaction products in real time. It is able to detect minimal amounts of nucleic acid with high specificity and sensitivity. This technique is used both for diagnostic and research applications. Diagnostic real-time PCR enables the detection of genes involved in infectious diseases, cancer and genetic abnormalities. In the research setting, real-time PCR is used to provide highly sensitive quantitative measurements of gene transcription. The technique may be used to determine the genetic expression of a particular gene and its changes over time, e.g. in the analysis of cellular response to a therapeutic agent or to changes in the microenvironment, or to assess the progression of cell differentiation.

Keywords: real-time PCR, quantitative PCR, multiple myeloma, gene expression.

Minimální reziduální onemocnění

V klinické onkologii se metoda real-time PCR používá pro monitorování minimální zbytkové choroby (MRD minimal residual disease) zodpovědné za relaps onemocnění, což umožňuje předpovědět progresi onemocnění. Pro detekci MRD v hematologii je využíváno nejčastěji přeskupení imunoglobulinových genů a genů pro T-lymfocytární receptor TCR.

U myelomových plazmatických buněk vzniká v průběhu přeskupování genových segmentů imunoglobulinového těžkého řetězce (IgH) jedinečný klonotypický marker – oblast určující komplementaritu (CDR3). Kvantifikace reziduálních myelomových buněk může být použita jako prognostický faktor a marker účinnosti léčby (16, 17, 15).

Po allogenní transplantaci kmenových buněk mohou nastat komplikace způsobené akutní reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD). Znalost sekvence β-řetězce TCR receptoru jednotlivých T-buněčných klonů umožňuje sledovat přítomnost klonů specifických pro reakci štěpu proti hostiteli a reakci štěpu proti leukémii od pacientů po allogenní transplantaci kmenových buněk (11, 12). Alloreaktivní klonové T-lymfocyty způsobující GVHD mohou být před transplan-

tací identifikovány a kvantitativně monitorovány pro časné zahájení imunosupresivní léčby před propuknutím GVHD. Také další práce potvrdily roli odlišných klonů T-lymfocytů u GVHD a GVM (reakce štěpu vůči myelomu) u mnohočetného myelomu (MM) (4).

Voena a kolektiv sledovali souvislost mezi onemocněním reakce štěpu proti hostiteli a odpovědí pacienta na onemocnění. S použitím kvantitativní PCR prokázali, že perzistentní molekulární onemocnění se s časem dynamicky mění. (25).

Stanovení prognózy

V souvislosti se změnami v karyotypu u pacientů s MM, jako jsou například delece chromozomu 1 a 13 nebo reciproké translokace lokusu pro těžký řetězec (IgH) zahrnující chromozomy 4, 11, 14 a 16, dochází ke změně exprese genů, které jsou umístěny ve zmiňovaných oblastech (14). Pro nádorové buňky je typická zvýšená exprese transkriptů podporujících proliferaci buňky a tak mohou přispívat k nekontrolovatelnému množení maligních buněk. Nižší hladina RNA bývá zjištěna u antiapoptických genů, naopak zvýšená u proapoptických. Kvantitativní PCR je metoda vhodná pro

zjištění pacientů s lepší či horší prognózou na základě porovnání exprese vybraných genů.

Pro stanovení prognózy pacientů s MM se v současnosti používá tzv. stážovací systém ISS (International Staging System), který nahradil stážovací systém Durie-Salmon. Jako možnost predikce rizika MM se také nabízí cytogenetické hodnocení translokací chromozomu 14, delece 13 a stupeň ploidie. Stejně informace podává také molekulárně biologické vyšetření aktivity vybraných genů. Shaughnessy et al., v USA pomocí cDNA mikročipů zavedli tzv. 70-genový model, později omezili soubor ze 70 na 17 genů významných pro predikci rizika (27, 18). Expresí genů souvisejících s přežitím pacienta jsou podobné jak u nově diagnostikovaných pacientů s MM, tak i u pacientů v relapsu, bez závislosti na způsobu léčby. Využití expresních profilů umožňuje odlišit pacienty rezistentní na současně používané léky nebo léčebné kombinace (27). Změněná regulace transkripce genů může ovlivňovat vývoj onemocnění. Sledování exprese pomocí real-time PCR tak přispívá k identifikaci pacientů s vysokým rizikem progresu onemocnění.

Jedním z genů, které jsou dávány do souvislosti se stanovením prognózy u MM je cyklin D1 (CCND1 gen). Při sledování pacientů s MM pomocí cytogenetických metod a stanovením exprese RNA byla zjištěna vyšší hladina CCND1 mRNA u těch pacientů, kteří měli t(11;14) nebo trizomii 11 než u pacientů bez abnormalit jedenáctého chromozomu. V italské studii z roku 2003 ze 74 pacientů s nově diagnostikovaným MM jich 43% vykazovalo vyšší expresi cyklinu D1. U těchto pacientů byla zjištěna delší doba remise a delší doba přežívání bez příznaků choroby (EFS – event-free survival). Nebyl nalezen rozdíl u pacientů léčených jednoduchou nebo dvojitou autologní transplantací (21). Tajima a kolektiv publikovali v roce 2005 výsledky své práce, ve které se zaměřili na stanovení exprese šesti protoonkogenů (CCND1, FGFR3, c-MAF, MAFB, MUM1/IRF4, and c-MYC), které jsou spojovány s translokací 14q32. Expresí genů CCND1, FGFR3, c-MAF, MAFB byla vyšší u myelomových buněčných linií, které obsahují translokace zahrnující tyto lokusy, než u vzorků kostní dřeně. U dalších dvou genů, MUM1 a c-MYC, byla hladina RNA vyšší u linií než u myelomových buněk kostní dřeně, a to bez ohledu na stav chromozomálních translokací (22).

Enzym spojený se zánětlivou odpovědí, cyklooxygenáza 2 (COX-2) byla zjištěna u 11% MGUS, 31% MM v době diagnózy a 47% relapsů/refrakterního onemocnění. Pozitivita COX-2 je spojena s horší prognózou (8).

Kvantitativní PCR se uplatňuje také při studiu mikroprostředí kostní dřeně. Heparanáza je enzym, který štěpí heparan sulfát proteoglykan (syndecan-1). Vyšší exprese heparanázy v mikroprostředí kostní dřeně je spojena s kratším přežitím pacientů (9).

Geny rezistence

Existují geny determinující rezistenci buněk na léčbu, u kterých byla popsána změněná exprese u různých typů maligních onemocnění. Příkladem jsou mnohočetné lékové rezistence, které vznikají na celou skupinu léčiv s odlišnou strukturou a mechanismem účinku. Stěžejním faktorem této skupiny genů je gen pro mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR1, ABCB1), který kóduje P-glykoprotein (p-gp) s funkcí trans-

portního proteinu. Pacienti s MM, kteří neodpovídají na chemoterapii často mají zvýšenou hladinu MDR1 RNA (13). Také u připravených chemorezistentních linií byla zjištěna vyšší exprese tohoto genu na rozdíl od senzitivních buněk (24). Substrátem P-gp jsou některá protinádorová léčiva (antracykliny, vinca alkaloidy, kolchicin, actinomycin D). Expresí P-gp koreluje s resistencí vůči taxanům a doxorubicinu *in vitro* (10). V případě zvýšené exprese MDR1 mohou být léčiva, která jsou substráty P-gp, předčasně vylučována z nádorových buněk, což může vést k poklesu účinku léčby. Sledování exprese genu MDR1 tak může sloužit k predikci úspěšnosti chemoterapie. Vysoká exprese MDR1 je často pozorována u pacientů již dříve léčených cytostatiky, což podporuje názor, že tento gen je indukován selektivním procesem během opakovaného vystavení lékům (5). Také protinádorové agens mohou aktivovat transkripci P-gp (3, 7).

Další z genů dávány do souvislosti s resistencí na chemoterapii a kratším přežitím u pacientů s MM je LRP (lung resistance protein), který zabezpečuje intercelulární a nukleocytoplazmatický transport (13). MRP (multidrug-resistance associated protein) gen leží na chromozomu 16 a funguje jako transportér. Podobně jako P-gp přispívá k rezistenci k anthracyklinům (6, 19, 20). Na rezistenci MM buněk se podílí také gen ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein). Expresí tohoto genu v MM liniích je zvýšena po vystavení buněk chemoterapeutickým agens, které jsou substráty ABCG2 (23).

Nádorové antigeny

Real-time PCR slouží také ke stanovení a potvrzení hladiny exprese nádorově specifických antigenů. Nádorové testikulární antigeny (CT), které jsou exprimovány pouze v maligních buňkách a testes, představují atraktivní cíl pro imunoterapeutické přístupy. Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny, zpravidla prostřednictvím dendritických buněk (DB), které jsou naloženy specifickým nádorovým antigenem. Prostřednictvím aktivace protinádorových T-lymfocytů dochází k cílenému zabíjení nádorových buněk.

Condomines a kolektiv (2) sledovali expresi 46 CT antigenů. Z nich 35 bylo exprimováno u purifikovaných MM buněk alespoň u jednoho pacienta. Expresí 6 CT genů je spojena s kratší dobou přežívání bez příznaků choroby (EFS, event-free survival). Všechny tyto geny (CTAG1B, CTAG2, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A6) leží na chromozomu X. Myelomové buňky 98% pacientů exprimují alespoň jeden CT gen, 86% sledovaných pacientů exprimovalo dva a 70% minimálně tři CT antigeny. Skupina autorů z Brazílie sledovala 14 vybraných CT antigenů u vzorků zdravých tkání, kostní dřeně, vzorků MGUS, solitárního plazmacytomy, MM vzorků a buněčné linie. Jako kandidáty pro imunoterapii našli tři geny – MAGEC1/CT7, MAGEA3/6 a LAGE-1, které jsou nacházeny u 85% všech MM vzorků. Potvrdili, že vliv na prognózu MM pacientů má exprese genů rodiny GAGE, > 6 CT antigenů a MAGEC1/CT7 (1).

Poděkování:

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 2008; 8:2
- Condomines M, Hose D, Raynaud P et al. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol.* 2007; 178(5):3307-15
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 1987; 84: 265-9
- Galimberti S, Benedetti E, Morabito F et al. Different gamma/delta T clones sustain GVM and GVH effects in multiple myeloma patients after non-myeloablative transplantation. *Leuk Res.* 2006;30(5):529-35
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal National Cancer Institute* 1989; 2: 116-24
- Hart SM, Ganeshaguru K, Hoffbrand AV et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) in acute leukaemia. *Leukemia* 1999; 48: 2163-8
- Kohno K, Sato S, Takano H et al. The direct activation of human multidrug resistance gene (mdr1) by anticancer agents. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1989; 165: 1415-21
- Ladetto M, Vallet S, Trojan A et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood.* 2005; 105(12):4784-91
- Mahtouk K, Hose D, Raynaud P et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2007; 109(11):4914-23
- Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S et al.: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 1998, 4(2): 389-398
- Michalek J, Collins RH, Durrani HP et al. Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):1180-4 a)
- Michalek J, Collins RH, Hill BJ et al. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet.* 2003;361(9364):1183-5 b)
- Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, et al. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Hematol.* 2006;81(11):824-31
- Nishida K, Tamura A, Nakazawa N et al. The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood.* 1997;90(2):526-34
- Raab MS, Cremer FW, Breitkreutz IN et al. Molecular monitoring of tumour load kinetics predicts disease progression after non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Ann Oncol.* 2005;16(4):611-7
- Ralph QM, Brisco MJ, Joshua DE et al. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: evidence from the Ig heavy chain gene. *Blood* 1993; 82:202-6
- Sarasquete ME, García-Sanz R, González D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica.* 2005;90(10):1365-72
- Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 2007 Mar 15;109(6):2276-84
- Schneider E, Cowan KH, Bader H et al. Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed leukemia. *Blood* 1995; 85: 186-90
- Slapak CA, Mizunuma N, Kufe DW. Expression of the multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. *Blood* 1994; 84: 3113-21
- Soverini S, Cavo M, Cellini C et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood.* 2003;102(5):1588-94
- Tajima E, Uranishi M, Iida S et al. Global real-time quantification/reverse transcription-polymerase chain reaction for detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation in multiple myeloma. *Haematologica.* 2005; 90(4):559-62.
- Turner JG, Gump JL, Zhang C et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108(12):3881-9
- van Hille B, Lohri A, Reuter J, Herrmann R. Nonradioactive quantification of mdr1 mRNA by polymerase chain reaction amplification coupled with HPLC. *Clin Chem.* 1995;41(8 Pt 1):1087-93
- Voena C, Malnati M, Majolino I et al. Detection of minimal residual disease by real-time PCR can be used as a surrogate marker to evaluate the graft-versus-myeloma effect after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(8):791-3
- Zhan F, Barlogie B, Mulligan G et al. High-risk myeloma: a gene expression based risk-stratification model for newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose therapy is predictive of outcome in relapsed disease treated with single-agent bortezomib or high-dose dexamethasone. *Blood.* 2008; 111(2): 968-9
- Zhan F, Huang Y, Colla S et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108(6):2020-8