

Semikvantitativní stanovení mRNA pro thymidylát syntázu a dihydropyrimidin dehydrogenázu u kolorektálních karcinomů: metodické aspekty a význam vnitronádorové variability pro určení rezistence na fluoropyrimidinová cytostatika

Semiquantitative determination of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA in colorectal carcinomas: methodical aspects and the impact of intratumoral variability for the determination of resistance to fluoropyrimidine anticancer drugs

SVOBODA M., ŽALOUĐÍK J., VYZULA R., DOMANSKÁ O., KOCÁKOVÁ I., COUFAL O., MALÁSKA J.

LABORATOŘ PREDIKTIVNÍ ONKOLOGIE A KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE,
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV A UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM V BRNĚ

Souhrn: 5-fluorouracil a příbuzná fluoropyrimidinová cytostatika jsou nejčastěji používanými při léčbě gastrointestinálních nádorů. Bohužel nádory mnoha pacientů jsou na tato cytostatika rezistentní. Tuto chemorezistenci provázejí změny v úrovni exprese genů kódujících enzymy pyrimidinového metabolismu v nádorových buňkách. Tyto geny pak mohou sloužit jako prediktory rezistence na cytostatika. Předkládaná studie ukazuje rozdíly v hladinách transkripce genů pro dva klíčové enzymy tohoto metabolismu u postoperativně odebraných vzorků kolorektálních nádorů. Hladiny transkripce genu thymidylát syntasy /TS/ jsou u nádorových buněk obvykle zvýšeny oproti kontrolní nenádorové tkáni. Medián pro TS mRNA je za identických experimentálních podmínek u nádorů roven 1.55, zatímco u kontrolní mukosy činí pouze 0.9. Hladiny transkripce genu dihydropyrimidin dehydrogenázy /DPD/ jsou mírně nižší v nádorové tkáni než v kontrolní nenádorové tkáni. Numerické rozdíly hladin TS mRNA za identických podmínek stanovení mezi různými částmi téhož nádoru mohou přesáhnout podle našich výsledků až 60 %. Metastázy se v expresi mRNA pro TS a DPD většinou liší od hladin transkripce v primární nádorové tkáni. Pro dosažení větší objektivity výsledků by se měly odebírat z nádoru dva vzorky. Kromě toho je vhodné odebírat, pokud je to možné, vzorky z metastáz.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, chemorezistence na fluoropyrimidiny, thymidylát syntáza, dihydropyrimidin dehydrogenáza

Summary: 5-fluorouracil and related fluoropyrimidine drugs are often used for the treatment of gastrointestinal cancers. Unfortunately tumors of some patients are resistant to these drugs. The chemoresistance is associated with changes in the level of expression of genes coding enzymes for pyrimidine metabolism in tumor cells. These genes can be used as predictors of chemoresistance to fluoropyrimidine anti-cancer drugs. This study shows the difference between the levels of transcription of genes for two key enzymes of pyrimidine metabolism in samples from different parts of colorectal tumors. The transcription levels of thymidylate synthase /TS/ gene are often increased in tumor cells, compared to reference nontumorous tissue. Median for TS mRNA is 1.55 in cancer tissue compared to 0.9 for control mucosa under identical experimental conditions. The transcription levels of dihydropyrimidine dehydrogenase /DPD/ are moderately lowered in tumor tissue compared to reference nontumorous tissue. The difference in numerical value of TS mRNA levels between different parts of the same tumor can vary by more than 60% under identical conditions of determination. Metastases have usually different mRNA levels of TS and DPD than the primary tumor tissues. Thus, for the objective results, at least two samples should be collected from every tumor. Moreover, it is recommended to take samples from metastases if possible.

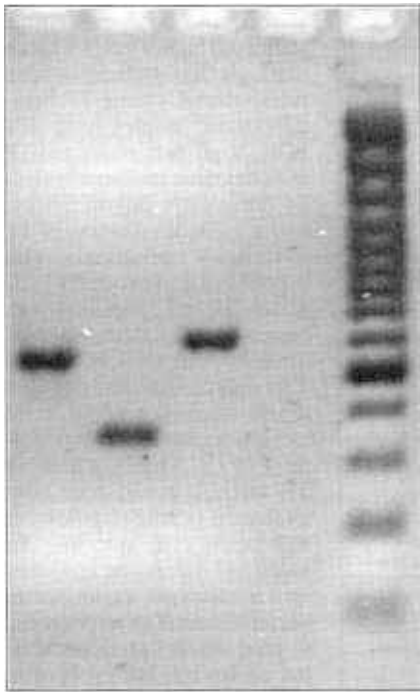
Key words: colorectal carcinoma, chemoresistance to fluoropyrimidines, thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase

Úvod

Thymidylát syntáza /dále jen TS/ je enzym katalyzující přeměnu deoxyuridin monofosfátu na deoxythymidin monofosfát, klíčovou složku pro syntézu DNA /1/. Dihydropyrimidin dehydrogenáza /dále jen DPD/ je enzym katalyzující odbourávání pyrimidinových nukleotidů /2/. Z rozdílného postavení těchto dvou enzymů v metabolismu nukleových kyselin vyplývají jejich různé mechanismy ovlivňování rezistence na fluoropyrimidinová analoga a relativní nezávislost těchto dvou enzymů. Nízké hladiny aktivního enzymu DPD v játrech u některých pacientů mohou být příčinou vysoké toxicity fluoropyrimidinových cytostatik /3/. Je známa mutace v genu pro DPD, která vede k nízké aktivitě DPD, ale ne všechny případy nízké aktivity DPD jsou s touto mutací asociovány /4/. Podle zahraničních studií korelují u gastrointestinálních nádorů vysoké hladiny mRNA pro TS a DPD v nádorové tkáni s rezistencí na fluoropyrimidinová cytostatika /5,6,7/. Proto

jsme se rozhodli zavést metodu neradioaktivní semikvantitativní RT PCR /dále semiQT RT PCR/ dle /5/ pro sledování hladin mRNA pro TS a DPD jako prediktorů nádorové rezistence a zvýšené citlivosti organismu na fluoropyrimidinová cytostatika. Jako kontrolní mRNA, k níž vztahujeme úroveň mRNA pro TS a DPD používáme gen pro glycerinaldehydfosfát dehydrogenázu /GAPDH/. Tento gen patří mezi tzv. housekeeping geny, jejichž mRNA hladiny jsou v buňce relativně stabilní. Protože je experimentálně obtížné určit absolutní hodnoty produkce určité mRNA, vztahují se hladiny určité mRNA vždy k hladině mRNA pro některý housekeeping gen. Výsledky pak prezentujeme jako relativní poměr hladin mRNA pro TS/GAPDH nebo DPD/GAPDH. V dosavadních publikovaných studiích bohužel zatím nebyly použity jednotné standardní postupy stanovení hladin mRNA pro TS a DPD. Proto vycházejí v každé jednotlivé studii pro každou odlišnou metodu stanovení TS, DPD mRNA jiné absolutní mezní hodnoty.

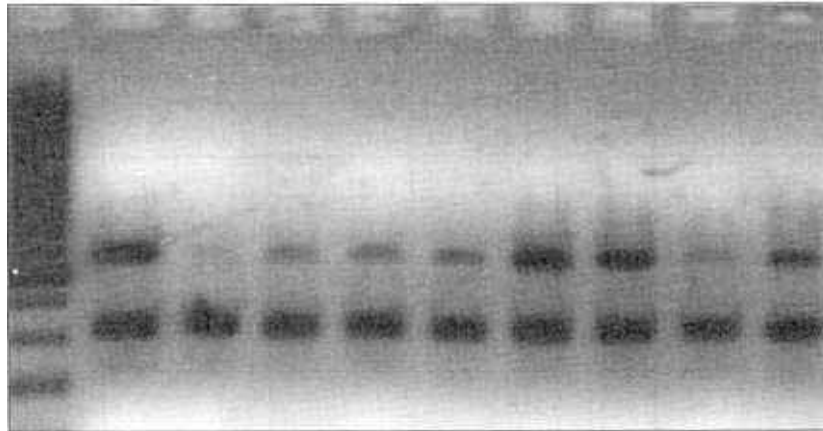
DPD GAPDH TS M



Obr.1: RT PCR fragmentů mRNA pro /zleva/ dihydropyrimidin dehydrogenázu /DPD, 514 páru bází- bp/, glyceraldehydfosfát dehydrogenázu /GAPDH, 328 bp / a thymidylát syntázu /TS, 579 bp/. Vpravo 100 bp marker /M/.

Obr. 2 : Semikvantitativní duplexová RT PCR vzorků kolorektálních nádorů a nenádorové střevní mukózy. Realtivní stanovení hladiny mRNA thymidylát syntázy vzhledem ke hladině mRNA glyceraldehydfosfát dehydrogenázy. Písmenem T označeny tumory, K – kontrolní mukóza, M –metastáza. Indexy A, B, C, D –označení pacientů A,B, atd. TA je tedy tumor pacienta A, KB je kontrolní mukóza pac.B atd. TS = horní proužek, GAPDH = spodní proužek v každé elektroforetické dráze.

Pac. A Pac. B Pac. C Pac.D
 TA KA TB TB KB TC MC KC TD



ty, při nichž je prokazatelná rezistence na fluoropyrimidinová analogá. To komplikuje situaci a nelze pro předpovídání rezistence na fluoropyrimidinová analogá převzít mezní /tzv. cutoff/ hodnoty naměřené jinou metodou semiQT RT PCR.

Pacienti a metodiky

Pacienti: Sledovali jsme 31 pacientů s primárními kolorektálními karcinomy. Všechny nádory a kontrolní nenádorová tkáň střevní sliznice byly vyšetřeny po resekci za podmínek uvedených níže. Pacienti nepodstoupili před resekci žádnou chemoterapii.

Způsob postoperačního odběru vzorků: Tkáňové nádorové vzorky byly odebírány mimo nekrotickou oblast tumoru a jako kontroly jsme použili vzorky normální sliznice střeva vzdálené od nádoru. Pro hodnocení vnitronádorové variability náleží byly odebírány dva vzorky z různých částí nádorového ložiska. Vzorky byly nejpozději do 15 min po resekci přeneseny do kryozkumavek typu Nunc a uloženy v kapalném dusíku.

Metody: Zamražené vzorky uskladněné do poslední chvíle v tekutém dusíku v objemu 20–50mg byly homogenizovány tkáňovým homogenizátorem při 30 000 ot/min, po dobu cca 30–40s. Celková RNA byla izolována pomocí kitu RNAasy (Quiagen, Germany) . Kvalitu a množství RNA stanovujeme elektroforeticky a fotometricky /8/. K reversní transkripci RNA na cDNA používáme 1 ug výchozí celkové RNA a M-MuLV reversní transkriptázu (Fermentas, Vilnius, Litva). Jako primer slouží oligo d(T)₁₈/Generi Biotech, ČR./ Reversní transkripce probíhá 1 hod. při 42°C. Podmínky pro duplexovou PCR /"hot start"/: primery pro TS, DPD, primery pro referenční GAPDH /Generi Biotech/ v koncentracích dle /5/, dNTP 0.2mM, 1.25 u Taq polymerázy, obojí od fy. Fermentas Vilnius. Úvodní denaturace 95 °C –3min, cyklování 94 °C –45s, 60 °C 1min, 72 °C –2 min, vše 30x, v cyklu Biometra T-Gradient. Duplexovou PCR opakujeme při třech různých koncentracích cDNA, tak aby PCR byla v lineární fázi amplifikace. Výsledné produkty PCR rozdělujeme na 2% agarosovém gelu obarveném ethidium bromidem /viz obr.1/. Poměr intenzit fluorescence RT PCR produktů TS/GAPDH a nebo DPD/GAPDH určujeme densitometricky.

Výsledky

V krátké době, po kterou máme metodiku zavedenu, nemůžeme zatím statisticky vyhodnotit klíčový vztah mezi hladinou

TS mRNA a účinností léčby fluoropyrimidinovými cytostatiky, na hodnocení této asociace však intenzivně pracujeme. V této studii jsme se zaměřili pouze na metodické aspekty detekce transkriptů TS a DPD a sledování vnitronádorové a meziložiskové variability výsledků.

Na obr.1 je vidět, že RT PCR jednotlivých fragmentů je optimalizována správně, bez vedlejších produktů, což je velmi důležité pro úspěch duplexové RT PCR klinických vzorků. Při duplexové RT PCR pro TS nebyly zaznamenány žádné vedlejší produkty /viz obr. 2/ a každý vzorek byl amplifikován nejméně při třech různých koncentracích mRNA, tak aby PCR probíhala v lineární fázi amplifikace. Fotografie gelu byla densitometrována a vypočítány poměry intenzity fluorescence TS/GAPDH.

Z obr. 2 je vidět, že každý vzorek má jiné intenzity TS, zatímco intenzita tzv. housekeeping genu GAPDH zůstává u všech vzorků přibližně stejná. Z obrázku je rovněž vidět, že kontrolní nenádorová tkáň má nižší hladiny TS mRNA než tkáň nádorová /viz též tab. 1/.

Vnitronádorová variabilita v hladinách TS mRNA je poměrně velká viz tabulka 3, avšak hladiny TS mRNA ve střevní sliznici jsou poměrně stabilní a jsou nižší než hladiny v nádorech (viz tabulka 2).

Enzymová aktivita TS , množství TS proteinu a hladiny mRNA nejsou ve vzájemné lineární korelaci /5/. Přesto však platí, že enzymová aktivita je vyšší v nádorech než v mukose a rovněž tak hladiny mRNA jsou u daného jedince vyšší v nádoru než v mukose/5/. Naše výsledky studia hladin mRNA

Tab.1. Hodnoty poměru TS/GAPDH v kontrolní mukose:

Nejnižší zjištěná hodnota	Nejvyšší zjištěná hodnota	Medián	Počet vzorků
0,01	2,17	0,9	26

Tab.2. Hodnoty poměru TS/GAPDH v kolorektálních nádorech (mezi-nádorová variabilita):

Nejnižší zjištěná hodnota	Nejvyšší zjištěná hodnota	Medián	Počet vzorků
0,02	3,62	1,55	42

Tab. 3. Vnitronádorová variabilita hodnoty poměru TS/GAPDH:

pacient	Tumor odběr 1	Tumor odběr 2	Rozdíl odb.1-odb.2 v % max.hodnoty	Metastáza	Kontrolní nenádorová tkáň	Poměr
						Tu odběr1/ nenád.tk Tu odběr2/ nenád.tk metastáza/nenád.tk
M112	3,00		–	1,79	0,22	13,6 prim.tum/nenád. 8,1 met/nenád.tk
M138	1,20	1,46	21 %	2,00	0,90	1,3, 1,6 prim.tum. 2,2 met.
M142	1,39	1,40	0,7 %		1,64	0,8, 0,8. prim.tum.
M164	0,53	0,71	25,3		0,53	1,0, 1,3 prim.tum.
M169	2,58	1,00	61,2		2,19	1,1, 0,4 prim.tum.
M173	0,70		–	1,62	0,17	4,1 prim. tum. 9,5 met.
M210	1,50			090	–	
M242	3,61			3,10met +3,10adenom	0,92	3,9 prim. tum 3,3 met., 3,3 aden.
M247	1,38	0,63	54,3		0,01	138,0, 63,0 prim.t.
M216	1,56	0,77	50,6		1,48	1,0, 0,5 prim.tum

tomu odpovídají /viz tabulky/. Vysoké hodnoty TS jsou velice často asociovány s rezistencí na fluoropyrimidinová cytostatika /10,11/. Podle našich výsledků je variabilita hladin mRNA nezanedbatelná a existují rozdíly cca +/- 0,7 (60%) v hladině mRNA v rámci jediného tumoru /viz tab.3/. Z tohoto důvodu je potřebné odebrat pro stanovení TS dva vzorky tkáně z každého nádoru.

Hladiny DPD mezi nádorem a kontrolní mukózou se tak významně neliší jako u TS /viz tab. 4, 5./. Častěji jsou hladiny DPD mírně nižší v nádorech než v kontrolní mukóze /62 % případů/.

Tab. 4. Hodnoty poměru DPD/GAPDH v kontrolní mukose:

Nejnižší zjištěná hodnota	Nejvyšší zjištěná hodnota	Medián	Počet vzorků
0,21	1,42	0,56	10

Tab. 5. Hodnoty poměru DPD/GAPDH v kolorektálních nádorech (mezinádorová variabilita):

Nejnižší zjištěná hodnota	Nejvyšší zjištěná hodnota	Medián	Počet vzorků
0,18	1,19	0,47	18

Diskuse

Cytostatikem první volby jsou u kolorektálních nádorů 5-fluorouracil nebo příbuzná fluoropyrimidinová cytostatika /12/. Fluoropyrimidinová cytostatika inhibují thymidylát syntázu (TS), která je nezbytná pro syntézu DNA. Vysoké hladiny TS u některých nádorů jsou jednou z příčin, proč uvedená cytostatika jsou někdy málo účinná nebo neúčinná při léčbě /1,7/. Několik pracovních skupin provádí sledování vztahu hladin TS, enzymové aktivity TS a mRNA k rezistenci na fluoropyrimidinová cytostatika /1,2,5,7/. Podle posledních závěrů je však rezistence nádorů vůči 5-fluorouracilu způsobena také zvýšenými hladinami exprese mRNA kteréhokoliv z následujících enzymů: thymidylátsyntázy /TS/, dihydropyrimidindehydrogenázy /DPD/ nebo thymidylátfosforylázy /TP/ /7/.

V současné době provádíme stanovení hladin mRNA všech markerů fluoropyrimidinového metabolismu včetně TP neradioaktivní duplexovou RT PCR. V případě stanovení TP však nemáme možnost výsledky porovnat s jinými autory, neboť výsledky stanovení TP mRNA v neradioaktivním uspořádání duplexové RT PCR nikdo dosud nepublikoval. Naše výsledky sledování hladin mRNA ukazují, že hladiny TS v mukóze /medián 0,9/ jsou téměř totožné s údaji, které uvádějí japonští autoři /medián 0,91 /5/. Mediány hladiny TS mRNA v nádorech nám vycházejí přibližně poloviční než japonským autorům. To může být mimo jiné způsobeno rozdílným zastoupením pacientů, kteří nebyli podrobeni před resekci předoperačnímu ozařování. Jak vyplývá ze sledování pacientů s radioterapií,

mají tyto zákroky vliv na expresi mRNA pro TS a TP jak v tumoru, tak v kontrolní mukóze /vlastní pozorování, publikace v přípravě/. Kromě toho se na rozdílech zřejmě podílí i známá etnická variabilita hladin TS /14/.

Podle našich předběžných výsledků je v naší populaci asi 40% 3/3 homozygotů s tandemovým opakováním tří kopií repetitivní sekvence TS promotorové enhancerové oblasti. 3/3 homozygoti jsou známi vyšší expresí genu thymidylát syntázy v nádorech /15/. V citované práci však nesledovali hladiny TS v kontrolní tkáni, takže nevíme, zda vyšší hladiny jsou indukované pouze v nádorech, nebo zda jde o konstitutivně zvýšenou expresi TS u 3/3 homozygotů bez ohledu na nádorové bujení. Procentová hodnota zastoupení 3/3 homozygotů v naší populaci (40%) je v souladu s hodnotami ve skotské populaci (37%) /14/. Japonská populace má zhruba o 25% vyšší frekvenci alely 3 než kavkazská rasa /14/ a lze tedy předpokládat vyšší zastoupení pacientů s vysokými hladinami TS oproti naší populaci. Japonští autoři vyšetřili celkem 26 pacientů s kolorektálními nádory, naše měření zahrnují výsledky 31 pacientů. Možným důvodem rozdílu je efekt malých čísel a odlišné zastoupení různých stadií dle TNM klasifikace.

Přestože chemoterapie kolorektálního karcinomu 5-fluorouracilem představuje současný „zlatý standard“, odpovídá na ni příznivě pouze třetina nádorů. Situace není o mnoho lepší ani u nových fluoropyrimidinových preparátů. Jednou z cest jak zvýšit efektivitu chemoterapie kolorektálního karcinomu je individualizovaná indikace typu cytostatika podle specifických prediktorů TS, DPD a TP, které úzce souvisejí s metabolismem cytostatika přímo v nádorové tkáni. Investovat je zapotřebí nejen do léčby, nýbrž především do diagnostiky vedoucí k racionální indikaci léčebného postupu. Tato cesta není snadná a vyžaduje důkladné metodické zabezpečení, na jehož aspekt vnitronádorové variability výsledků jsme v této práci upozornili dříve než zhodnotíme korelace laboratorních nálezů a klinické efektivity.

Poděkování:

Práce byla podpořena prostředky výzkumného záměru MŠMT J07/98-141100003. Autoři děkují MUDr. Daliboru Valíkovi, vedoucímu oddělení laboratorní diagnostiky MOÚ, za umožnění fotometrických měření.

Literatura

1. Bathe OF, Franceschi D, Livingstone AS, Moffat FL, Tian E, Ardanan B.: Increased thymidylate synthase gene expression in liver metastases from colorectal carcinoma: implications for chemotherapeutic options and survival. *Cancer J Sci Am.* 1999 Jan-Feb;5(1):34-40.
2. Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N, Schneider M, Thyss A, Demard F, Milano G.: Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol.* 1995 Jul;13(7):1663-70.
3. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renee N.: Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer.* 1999 Feb;79(3-4):627-30.
4. Ridge SA, Sludden J, Wei X, Sapone A, Brown O, Hardy S, Canney P, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Cassidy J, McLeod HL.: Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998;77(3):497-500.
5. Miyamoto S, Ochiai A, Boku N, Ohtsu A, Tahara M, Yoshida S, Okabe H, Takechi T, Fukushima M. Discrepancies between the gene expression, protein expression, and enzymatic activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa. *Int J Oncol.* 2001 Apr;18(4):705-13.
6. Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, Takechi T, Okabe H, Fukushima M, Kitajima M.: Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Jan;91(1):105-12.
7. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV.: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res.* 2000 Apr;6(4):1322-7.
8. Sambrook J, Russell D.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
9. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold, WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet.* 2000 Mar;24(3):236-44.
10. Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, Francoual M, Poissonnet G, Fontana X, Schneider M, Demard F, Milano G.: A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Br J Cancer.* 1999 Apr;79(11-12):1864-9.
11. Iqbal S, Lenz HJ.: Determinants of prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep.* 2001 Mar;3(2):102-8. Review.
12. Kessler H, Milson JV.: *Cancer of the Colon and Rectum.* In: *Manual of Clinical Oncology*, p. 477,488. Polack RE, ed. Willey-Liss, New York, Singapore, Toronto 1999.
13. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C.: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Review, *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):979-94.
14. Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL.: Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics.* 1999 Jun 15;58(3):310-2.
15. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y.: Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers *Anticancer Res.* 1999 Jul-Aug;19(4B):3249-52.