Polimorfizam gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde

3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Gene Polymorphism amongst Patients with Thyroid Gland Cancer

Jelena Pjevalica¹, Nevena Popovac¹, Momčilo Ristanović^{1,2}

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

² Institut za humanu genetiku

Kontakt: jelenapjevalica@yahoo.com

Sažetak

Uvod: Karcinom štitne žlezde je jedan od ređih karcinoma u muškoj populaciji, zastupljen u svega 2% svih maligniteta, ali je najčešći karcinom endokrinog sistema i odgovoran je za 95% novih slučajeva svake godine. Novija istraživanja su pokazala uticaj naslednih i faktora sredine na nastanak ovog oboljenja. Povećana ekspresija gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu (3-PHGDH) jedan je od faktora koji doprinose onkogenezi jer povećava proliferaciju ćelija.

Cilj: Cilj studije je poređenje učestalosti polimorfizma gena za 3-PHGDH kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na genotip zdravih muškaraca.

Materijal i metode: Studija je obuhvatila 80 muškaraca sa karcinomom štitne žlezde koji su lečeni u Centru za endokrinu hirurgiju Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije i 100 zdravih muškaraca - dobrovoljaca. Genomska DNK je izolovana metodom isoljavanja. Genotip pacijenata je određen lančanom reakcijom polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR), metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i gel-elektroforezom.

Rezultati: Rezultati istraživanja su pokazali da postoji statistički veoma značajna razlika između genotipa obolelih od karcinoma štitne žlezde i grupe zdravih muškaraca kod rs541503 polimorfizma gena za 3-PHGDH ($\chi^2 = 38,924$; $p = 0,001$). Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde najčešći genotip je TT, a u kontrolnoj grupi TC. Učestalost glavne frekvencije alela (engl. major allele frequency, MAF(C)) u kontrolnoj grupi u našoj studiji iznosila je 0,61. Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde MAF(C) je bila skoro dvostruko manja i iznosila je 0,31. Poređenje učestalosti alela u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu pokazalo je statistički veoma značajnu razliku ($\chi^2 = 18,1159$; $p = 0,001$).

Zaključak: C alel bi mogao da predstavlja protektivni faktor za sprečavanje nastanka karcinoma štitne žlezde. Osobe sa TT genotipom imaju šest puta veću šansu da dobiju karcinom štitne žlezde u odnosu na osobe sa CC genotipom.

Ključne reči: gen za PHGDH, karcinom štitne žlezde, PCR, RFLP.

Abstract

Introduction: Thyroid gland cancer is a rare malignancy in the male population, accounting for up to 2% of all cancers, but it is the most common cancer of the endocrine system, making up to 95% of all estimated new endocrine cancer cases each year. Recent studies suggested an important role of both environmental and genetic factors in cancerogenesis. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (3-PHGDH) gene overexpression is associated with pathogenesis of human cancer and contributes to cell proliferation.

Aim: To assess the association of PHGDH gene polymorphism in the group of patients with thyroid gland cancer and the control group of healthy men.

Materials and methods: The study encompassed 80 men diagnosed with thyroid gland cancer in Center for Endocrine Surgery, Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Clinical Center of Serbia and 100 healthy male volunteers. The DNA was isolated from the peripheral blood with solting out method. The genotypes of 3-PHGDH polymorphism were determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Gel-electrophoresis was used to separate DNA fragments.

Results: There was a statistically highly significant difference between frequencies for genotype distribution of rs541503 polymorphism in patients with thyroid gland cancer and healthy volunteers ($\chi^2 = 38.924$; $p = 0.001$). We found that in patients with thyroid gland cancer, the most common genotype is TT and in the control group TC. Major Allele Frequency (MAF (C)) in the control group in our study was 0.61. In patients with carcinoma of the thyroid gland MAF (C) was almost twice lower at 0.31. Allele frequencies in a group of patients with thyroid gland carcinoma compared to the control group showed a statistically significant difference ($\chi^2 = 18.1159$; $p = 0.001$).

Conclusion: C allele could be a protective factor in the prevention of the thyroid gland cancer. People with TT genotype are six times more likely to develop thyroid cancer compared to those with the CC genotype.

Key words: PHGDH gene, thyroid gland cancer, PCR, RFLP.

Uvod

Karcinom štitne žlezde zastupljen je u svega 2% svih malignih tumora, sa incidencijom od 1 do 8 na 100 000 stanovnika. Iako redak, ovo je najčešći karcinom endokrinog sistema i odgovoran je za 95% novih slučajeva svake godine. Podaci iz savremene literature ukazuju na postepeno povećanje njegove incidencije (1).

Prosečna starost u vreme postavljanja dijagnoze karcinoma štitne žlezde iznosi 45 godina. Kod žena se dijagnoza najčešće postavlja između 35. i 49. godine života, a kod muškaraca između 40. i 55. godine života. Žene obolevaju 2-3 puta češće nego muškarci (1).

Mehanizmi koji uzrokuju nastanak ovog karcinoma su izuzetno složeni jer u tom procesu učestvuje veliki broj gena. Potreban je niz mutacija da bi došlo do postepene transformacije normalne ćelije u malignu (1).

Proizvod gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu (PHGDH) uključen je u sintezu aminokiseline L-serin. L-serin je neesencijalna aminokiselina koja se dobija iz 3-fosfoglicerata, intermedijera glikolize, a 3-fosfoglicerat dehidrogenaza je enzim koji katališe prvi korak ove reakcije (2). Ovo je glavni put sinteze L-serina i prisutan je u mozgu, testisima i bubrezima, ali i u ćelijama koje brzo proliferišu. L-serin ima bitnu ulogu u metabolizmu jer služi kao prekursor za sintezu aminokiseline glicina, cisteina, selenocisteina, a pošto se konvertuje u piruvat, može se koristiti u glukoneogenezi i lipogenezi (3, 4). Gen za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu sastoji se iz 12 egzona i nalazi se na kratkom kraku hromozoma 1 (1p12) (3-5). U tumorskim ćelijama je dokazana pojačana ekspresija gena za 3PHGDH (5). Jedan od mehanizama koji pojačava ovu aktivnost je povećanje broja kopija gena za 3PHGDH (5). Istraživanja su dokazala prisustvo duplikacija gena za 3PHGDH u regionu 1p12 kod različitih malignih tumora (5).

Novija istraživanja su pokazala da je povećana ekspresija 3PHGDH gena jedan od glavnih faktora koji doprinosi nastanku malignog melanoma. Ekspresija proteina ovog gena je dokazana imunohistohemijski u 21% uzoraka malignog melanoma. Metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) otkriveni su duplikati istog gena kod 21 od 42 uzorka kod kolorektalnog karcinoma u pericentromernom regionu prvog hromozoma (5). Supresija gena za 3PHGDH u ćelijskim kulturama sa povećanom ekspresijom gena za 3PHGDH imala je za posledicu smanjenje ćelijske proliferacije i smanjenu sintezu serina (6).

Polimorfizam na nivou jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) rs541503 ogleda se u alteraciji T→C na poziciji 301 u genu za PHGDH, pri čemu je nemutirani (divlji) alel (engl. wild type, wt) T, a mutirani C (5, 6). Na osnovu podataka iz literature opisane su

promene na nivou jednog nukleotida koje se odnose na region rs541503 kod malignog melanoma i kolorektalnog kancera. Još uvek nema objavljenih rezultata koji dovode u vezu rs541503 polimorfizam PHGDH gena sa onkogenezo karcinoma štitne žlezde.

Cilj našeg istraživanja je bio da se utvrdi zastupljenost rs541503 polimorfizma gena za 3PHGDH kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde i uporedi sa genotipom zdravih muškaraca kontrolne grupe.

Materijal i metode

Ispitanici

Ispitivanu grupu je činilo 80 muškaraca obolelih od karcinoma štitne žlezde, koji su lečeni u Centru za endokrinu hirurgiju Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije u toku 2013. godine. Kontrolnu grupu je činilo 100 zdravih muškaraca. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta KCS.

Izolacija DNK

Genetičke analize su obavljene na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta. Svim ispitanicima je uzet uzorak od 5 mL venske krvi dobijen venepunkcijom, a genomska DNK izolovana je metodom isoljavanja prema prethodno opisanoj proceduri (7).

Lančana reakcija polimeraze (PCR reakcija)

Lančana reakcija polimeraze je rađena u termocikleru Applied Biosystems 2720. Za ovu metodu su korišćeni prajmeri koji ograničavaju region od 416 baznih parova (bp), u kome se nalazi polimorfno mesto T301C.

Sekvence prajmera su bile:

- sense-prajmer: 5'-TGA AGG TCC TGT GTG TGC TCT G- 3' i
- antisense-prajmer: 5'-TGA CTC CAG ACG CTA CTG CTC A-3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvođena u zapremini od 25 µL, koja je sadržala 16 µL vode, 2,5 µL 10 x PCR pufera, 2 µL 25 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM dNTP, 25 mM prajmere (po 1 µL svakog), 0,5 µL *Taq* polimeraze i 1 µL gemomske DNK ispitanika. Uslovi PCR su bili: početna denaturacija od 3 min na 94 °C, 30 ciklusa koji su se sastojali od 30 s na 94 °C, 55 s na 66 °C i 30 s na 72 °C i završna ekstenzija 5 min na 72 °C.

Metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP metoda)

Restrikcija PCR proizvoda je obavljena na 37 °C tokom noći. Restrikciona smeša se sastojala iz 5 µL PCR proizvoda, 2 µL 10 x Tango pufera, 12,5 µL vode i 0,5 µL MspI restrikcionog enzima (10 u/µL).

Elektroforeza na agaroznom gelu

Proizvodi PCR reakcije su proveravani gel-elektroforezom na 2% agaroznom gelu koji je obojen bojom SYBR-Safe i posmatrani su na UV transluminatoru (model Viler Lourmat TFX 20M). Na isti način je rađena i analiza restrikcionih fragmenata (slika 1).

U slučaju postojanja TT genotipa uočava se jedna traka dužine 416 bp. Kod TC genotipa dobijaju se tri fragmenta dužine od 416 bp, 217 bp i 199 bp, ali se zbog nedovoljnog razdvajanja fragmenata od 217 bp i 199 bp, na gelu uočava kao jedinstvena traka. Kod CC genotipa se iz istog razloga može videti jedan fragment dužine od oko 200 bp (koji predstavlja fragmente od 217 bp i 199 bp).

Slika 1. Analiza gela: kolone gledano sleva nadesno: marker (MAR=1000 bp), negativna kontrola (NEG), TC genotip-heterozigot (amplifikati od 416 bp i 200 bp), TT genotip (amplifikati od 416 bp) i CC genotip (oko 200 bp).

Statistička obrada podataka

Za procenu razlike u učestalosti alela i genotipova među grupama korišćeni su χ^2 test i multivarijantna logistička regresija. Statistički značajna razlika je ustanovljena na nivou verovatnoće od 95%.

Rezultati

Prosečna starosna dob pacijenata sa karcinomom štitne žlezde je bila 61,06 godina. U kontrolnoj grupi je prosečna starosna dob bila 38,46 godina.

Procentualna zastupljenost genotipova CC, TC i TT u kontrolnoj grupi je 40%, 42% i 18%, dok je procentualna

zastupljenost istih genotipova u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde 23,75%, 13,75% i 62,5%. U kontrolnoj grupi najveću učestalost ima genotip TC, a najmanju TT. Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde utvrđena je najveća učestalost genotipa TT, a najmanja genotipa TC (grafikon 1). Poređenje učestalosti genotipova u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu pokazalo je statistički veoma značajnu razliku ($\chi^2 = 38,924$; $p = 0,001$).

Grafikon 1. Zastupljenost genotipova u kontrolnoj grupi i među pacijentima sa karcinomom štitne žlezde.

Učestalost glavne frekvencije alela (engl. *Major Allele Frequency*, MAF(C)) u kontrolnoj grupi u našoj studiji iznosila je 0,61. Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde MAF(C) je bila skoro dvostruko manja i iznosila je 0,31 (grafikon 2). Poređenje učestalosti alela u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu pokazalo je statistički veoma značajnu razliku ($\chi^2 = 18,1159$; $p = 0,001$).

Grafikon 2. Zastupljenost alela u kontrolnoj grupi i među pacijentima sa karcinomom štitne žlezde.

Ako se za ispitivanje povezanosti genotipa i starosti ispitanika sa obolavanjem od karcinoma štitne žlezde prime-

ni multivarijantna logistička regresija, tada osobe sa TT genotipom (nakon prilagođavanja na starost ispitanika) imaju šest puta veću šansu da obole od karcinoma štitne žlezde u odnosu na osobe sa CC genotipom (**tabela 1**).

Tabela 1. Multivarijantna logistička regresija za zavisnu varijablu karcinom štitne žlezde.

	b	p	OR (95% IP)
genotip			
CC			1(referentna kategorija)
TC	-0,56	0,487	0,57 (0,12-2,76)
TT	1,76	0,022	5,80 (1,29-26,01)
starost	0,28	< 0,001	1,32 (1,21-1,43)

Diskusija

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoji statistički veoma značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između ispitanika i kontrolne grupe. Najčešći genotip među kontrolama je bio TC, dok je kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde najčešći genotip bio TT. Učestalost MAF(C) u kontrolnoj grupi bila je gotovo dvostruko veća u odnosu na grupu pacijenata sa karcinomom štitne žlezde.

Podaci iz literature dovode u vezu povećanu ekspresiju gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu u ćelijama malignog melanoma, ezofagusnog kancera, kancera dojke i kolorektalnog kancera i genotipa TT (6, 8, 9). Ektopična ekspresija PHGDH gena u epitelnim ćelijama može da dovede do morfoloških i funkcionalnih promena koje predisponiraju malignu transformaciju (10, 11). U regionu 1p12 nalazi se još nekoliko gena kandidata za koje se pretpostavlja da mogu doprineti kancerogenezi (4-6). Ovo je prva studija u Srbiji koja je imala za cilj da utvrdi udruženost polimorfizma gena za PHGDH sa karcinomom štitne žlezde. Rezultati naše studije su pokazali da je učestalost alela C skoro dvostruko manja u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno da osobe sa genotipom TT imaju 6 puta veću šansu da dobiju rak štitne žlezde u odnosu na osobe sa genotipom CC. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno urađenom sličnom studijom istog polimorfizma kod kolorektalnog karcinoma (12). Ovakvi rezultati idu u prilog istraživanjima kojima bi se bliže objasnila veza između alela C, metabolizma serina i nastanka karcinoma.

Iako je karcinom štitne žlezde češći kod žena, mi smo izveli studiju sa uzorcima dobijenim od muškaraca zato što je to najčešći endokrini tumor u muškoj populaciji i zato što smo imali adekvatnu kontrolnu grupu u vreme izvođenja studije.

Na osnovu iznetih podataka utvrdili smo da postoji izvesna veza između polimorfizma gena za PHGDH i karcinoma štitne žlezde, a u toku je opsežnija studija koja ima za cilj jasnije utvrđivanje ove veze, kao i utvrđivanje korelacije životnih navika, biohemijskih markera, histopatološkog i fizikalnog nalaza sa ovim genskim polimorfizmom.

Literatura

1. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR). Second Expert Report: Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC; 2007; 280-288.
2. Voet D, Voet J. Biochemistry- 4th edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 2010; 1071-1072.
3. Tabatabaie L, Koning TJ, Geboers AJ, van den Berg IE, Berger R, Klomp LW. Novel mutations in 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) are distributed throughout the protein and result in altered enzyme kinetics. Hum Mutat. 2009 May; 30(5):749-56.
4. Pind S, Slominski E, Mauthe J, Pearlman K, Swoboda KJ, Wilkins JA, et al. V490M, a common mutation in 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency, causes enzyme deficiency by decreasing the yield of mature enzyme. J Biol Chem. 2002 Mar 1; 277(9):7136-43.
5. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattiaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. Nat Genet. 2011 Jul 31; 43(9):869-74.
6. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional Genomics Reveal That the Serine Synthesis Pathway Is Essential in Breast Cancer. Nature. 2011 Aug 18; 476(7360):346-50.
7. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl Acid Res. 1988 Feb 11; 16(3):1215.
8. Antonov A, Agostini M, Morello M, Minieri M, Melino G, Amelio I. Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. Oncotarget. 2014 Nov 30; 5(22):11004-13.
9. Labuschagne C, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD. Serine, but Not Glycine, Supports One-Carbon Metabolism and Proliferation of Cancer Cells. Cell Rep. 2014 May 22; 7(4):1248-58.
10. Luo J. Cancer's sweet tooth for serine. Breast Cancer Res. 2011; 13(6):317.
11. Liu J, Guo S, Li Q, Yang L, Xia Z, Zhang L et al. Phosphoglycerate dehydrogenase induces glioma cells proliferation and invasion by stabilizing forkhead box M1. J Neuro-oncol. 2013 Feb; 111(3):245-55.
12. Ristanovic M, Novakovic I, Rovcanin B, Trifunovic J, Krivokapic Z. 3-phosphoglycerate dehydrogenase polymorphism in male patients with colorectal carcinoma. In: Lyonnet S, Schmidtke J, Brunner H, Houge G, Kääriäinen H, Read A, del Picchia J, editors. European Journal of Human Genetics. European Human Genetics Conference 2013; June 8 - 11, 2013; Paris, France. France: nature publishing group; June 2013. p. 287.