



Estimation of sodium/iodide symporter gene expression (NIS) in thyroid cancer by RT-PCR technique (preliminary study)

Milena Tosiek^{1#}, Lech Pomorski², Ewa Balcerczak¹, Marek Mirowski¹, Wojciech Czyż²

¹ Molecular Biology Laboratory, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University, Łódź, Poland

² Department of Endocrinological and General Surgery, Medical University, Łódź, Poland

[#] Students' Learned Societies, Molecular Biology Laboratory, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University, Łódź, Poland

Abstract

NIS gene is located on chromosome 19 and encodes 643 amino acid protein. It belongs to membrane Na⁺ dependent glucose symporter proteins family. In normal thyroid is located in basolateral membrane of thyrocyte. It plays a main role in concentrating of iodine in thyrocyte and thus in thyroid hormones synthesis. It was proved that *NIS* expression influences effectiveness of radioactive iodine therapy in well-differentiated thyroid cancers. The aim of this study was to estimate the *NIS* expression and its dependence with gender, age and stage in thyroid papillary and follicular cancers. The frozen sections of tissue were used as a source of tumor RNA. RT-PCR technique was employed for *NIS* expression analysis. We did not find dependence between the presence of *NIS* expression in investigated thyroid cancers and stage of disease estimated according to TNM classification. We also did not find dependence between *NIS* expression

and gender or sex of the patients. Our results suggest that there is no dependence between *NIS* expression and iodine uptake.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 1(56): 25-29)

Key words: sodium/iodide gene expression, thyroid cancer



Marek Mirowski
Molecular Biology Laboratory,
Department of Pharmaceutical Biochemistry,
Medical University,
Muszynskiego 1,
90-151 Lodz, Poland
tel/fax: 42 677-91-30,
e-mail: (mmirowski@pharm.am.lodz.pl)



Ocena ekspresji genu kodującego symporter sodowo/jodowy (NIS) w rakach tarczycy metodą RT-PCR (doniesienie wstępne)

Milena Tosiek^{1#}, Lech Pomorski², Ewa Balcerczak¹, Marek Mirowski¹, Wojciech Czyż²

¹ Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

[#] Studenckie Koło Naukowe przy Pracowni Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Gen *NIS* zlokalizowany na chromosomie 19 koduje białko złożone z 643 aminokwasów. Białko to należy do rodziny białek błonowych tzw. zależnych od Na⁺ symporterów glukozy. W prawidłowej tarczycy jest zlokalizowane w błonie podstawnej tyreocytu. Fizjologiczna rola białka *NIS* polega na współdziałaniu w biosyntezie hormonów tarczycy, umożliwia bowiem nagromadzenie w znacznym stężeniu jonów I⁻ w tyreocycie. Z doniesień literaturowych wynika, że w nowotworach złośliwych tarczycy (głównie pęcherzykowych i brodawkowatych) ekspresja genu *NIS* może wpływać na skuteczność rutynowo stosowanej terapii jodem radioaktywnym.

Celem pracy było określenie ekspresji genu *NIS* w rakach tarczycy, a także poszukiwanie zależności pomiędzy ekspresją badanego genu a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu oraz odpowiedzią na zastosowaną radioterapię.

Materiał do badań stanowiły mrożone skrawki tkankowe pochodzące z raków tarczycy. Metoda którą wykorzystano do badań była oparta na reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) wyizolowanego RNA, po której następowała reakcja PCR wykorzystująca startery swoiste dla genu *NIS*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ekspresja genu *NIS* pojawia się w różnych typach histologicznych raków tarczycy, głównie rakach

brodawkowatych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością ekspresji genu *NIS*, a stopniem zaawansowania klinicznego zbadanych nowotworów wg klasyfikacji TNM. Nie znaleziono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanego genu, a płcią i wiekiem pacjenta. Na bazie dotychczasowych wyników nie ustalono związku pomiędzy ekspresją genu *NIS*, a jodochwytnością zbadanych przypadków. Ustalenie zależności między ekspresją badanego genu, a skutecznością jodoterapii wymaga dalszych badań, z wykorzystaniem metody ilościowej.

(*Endokrynol Pol* 2005; 1(56): 25-29)

Słowa kluczowe: ekspresja genu symportera sodowo/jodowego, rak tarczycy



Marek Mirowski
Pracownia Biologii Molekularnej,
Zakład Biochemii Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź
tel/fax: 42 677-91-30,
e-mail: (mmirowski@pharm.am.lodz.pl)

Wstęp

Gen symportera sodowo-jodowego (*NIS*), sklonowany po raz pierwszy w 1996 roku, zlokalizowany jest u człowieka w pozycji 19p12~13.2. W obrębie genu występuje 15 eksonów i 14 intronów [1, 2]. Produktem genu *NIS* jest białko złożone z 643 aminokwasów o masie 90-97 kDa, które w warunkach prawidłowych jest zlokalizowane w błonie podstawnej (bazolateralnej) tyreocyty. Funkcją fizjologiczną symportera jest wychwyt jonów I⁻ z krwi i ich nagromadzenie w znacznym stężeniu we wnętrzu komórki tarczycy. W warunkach fizjologicznych gen *NIS* ulega ekspresji w komórkach tarczycy, ślinianek, żołądka, nerki, gruczołu sutkowego podczas laktacji oraz w warstwie cytotrofoblastycznej łożyska [3, 4]. W rakach tarczycy, chorobach autoimmunologicznych tarczycy, wrodzonej niedoczynności tarczycy oraz w chorobach niezwiązanych z gruczołem tarczowym, np. w raku piersi obserwowano zmienione poziomy mRNA dla genu *NIS*, jak również jego produktu białkowego. Doniesienia na temat ekspresji genu symportera w nowotworach tarczycy są niejednoznaczne – obserwowano obniżony poziom ekspresji tego genu [5-7], jak również jego nadekspresję [8, 9]. Ward i wsp., 2003 [7] stwierdzili, że brak ekspresji genu symportera wiąże się z większym zaawansowaniem nowotworu i gorszym rokowaniem dla pacjenta (badania na rakach brodawkowatych tarczycy).

Zdolność komórek tarczycy do wychwyty jodu jest podstawą do stosowania izotopów jodu (¹³¹I) w diagnostyce i terapii tego narządu [10]. Ekspresja genu symportera w rakach tarczycy może mieć wpływ na skuteczność zastosowanej radioterapii. Obecnie prowadzone są badania *in vitro*, polegające na wprowadzaniu genu symportera do komórek niejodochwytnych (np. raka prostaty, czerniaka złośliwego, watreby), celem uzyskania jodochwytności tych komórek [11].

Celem pracy było określenie ekspresji genu *NIS* w rakach tarczycy a następnie poszukiwanie zależności między ekspresją tego genu a płcią, wiekiem pacjenta, typem histologicznym nowotworu, stopniem zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM i jodochwytnością.

Materiał i metody

Pacjenci

Pacjenci byli operowani w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2003-2004. W badanej grupie było 20 kobiet i 4 mężczyzn, do 40 roku życia - 6, a powyżej - 18 osób.

Tkanki

Analizowany materiał stanowiły tkanki pozyskane w wyniku resekcji guzów tarczycy. 23 przypadki

sklasyfikowano jako raki a 1 przypadek jako gruczolak pęcherzykowy tarczycy. W badanej grupie raków wyodrębniono 18 raków brodawkowatych, 4 pęcherzykowe i 1 anaplastyczny.

Przygotowanie tkanek i izolowanie RNA

Zamrożone skrawki tkanek o masie ok. 20-50 mg wstępnie rozdrabniano sterylnym skalpelem i homogenizowano. Następnie izolowano całkowite RNA z komórek korzystając z zestawu odczynników „Total RNA Prep Plus” firmy A&A Biotechnology. Zasada izolowania opiera się na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego [12]. Stężenie wyizolowanego RNA sprawdzano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm.

Reakcja RT-PCR

Syntezę cDNA prowadzono przy użyciu odczynników „Enhanced Avian HS RT-PCR Kit” firmy Sigma. Do reakcji stosowano uniwersalny starter oligo(dT)₂₃, który zapewniał swoiste przepisane wszystkich poliadenylowanych mRNA. Przygotowywano na lodzie mieszaninę reakcyjną o składzie: całkowite komórkowe RNA (stężenie końcowe w mieszaninie 0,1 µg/µl), 1 µl uniwersalnego startera oligo(dT)₂₃ o stężeniu 3,5 µM, 1 µl mieszaniny deoksynukleotydów (po 500 µM dATP, dGTP, dTTP i dCTP) i woda wolna od nukleaz do objętości 10 µl. Próby inkubowano w temperaturze 70°C przez 10 minut. Następnie dodawano 1 µl odwrotnej transkryptazy eAMV-RT (Enhanced Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) o aktywności 200 U/µl w roztworze wodno-glicerolowym, 2 µl buforu dla AMV-RT, 1 µl inhibitora rybonukleazy o aktywności 20 U/µl i wodę wolną od nukleaz do końcowej objętości 20 µl. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 45° przez 50 min.

Reakcja PCR

Przygotowywano na lodzie mieszaninę reakcyjną o składzie: 1,8 µl buforu 10x, 1 µl MgCl₂ (stęż. 50 µM), 0,4 µl mieszaniny dNTP₃ (10 mM), 0,3 µl polimerazy Delta i po 0,7 µl każdego z primerów (0,5 µM). Sekwencję starterów zaplanowano w oparciu o dane z banku genów (starter 1: 5'-CAT GGA CGC CGT GGA GAC CGG-3'; starter 2 - 5'-GGG GAC TCC AGG CAG ATC TTC-3'). Warunki reakcji PCR zdefiniowano następująco: denaturacja wstępna DNA: 94°C, 1 min, denaturacja cykliczna: 94°C, 1 min, przyłączanie starterów: 60°C, 1 min, elongacja: 72°C, 2 min, elongacja końcowa: 72°C, 7 min, ilość cykli: 34. W reakcji PCR uzyskiwano produkt o długości 287 pz. Dla części prób przeprowadzono reakcję multiplex PCR z użyciem starterów dla genu β -aktyny jako genu referencyjnego (387 pz). Produkty reakcji PCR i multiplex PCR poddawano następnie rozdziałowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym.

Analiza statystyczna

Wyniki badań opracowano korzystając z programu komputerowego STATISTICA wersja 5.0.

Wyniki

Ekspresję genu *NIS* w badanych 24 próbach oceniano w sposób jakościowy metodą RT-PCR. Podstawą do stwierdzenia, że w danym przypadku gen *NIS* ulega ekspresji była obecność w elektroforegramie prążka o długości 287 pz przy braku prążków nieswoistych i czystej próbie kontrolnej. Ekspresję genu symportera stwierdzono w 9 z 24 zbadanych przypadków (37,5%).

W badanej grupie było 20 kobiet (83,3%) i 4 mężczyzn (16,7%). Ekspresję genu *NIS* stwierdzono wyłącznie u kobiet. Analiza statystyczna nie wykazała jednak istnienia zależności między ekspresją genu symportera a płcią ($p=0,2589$, dokładny test Fishera).

Ekspresję genu *NIS* odniesiono również do wieku pacjentów. Do celów statystycznych, pacjentów podzielono umownie na grupy do 40 r.ż. i po 40 r.ż. Ekspresję badanego genu stwierdzono w 4 z 6 przypadków pacjentów poniżej 40 r.ż. (66,7%) i w 5 z 18 przypadków pacjentów powyżej 40 r.ż. (27,7%) ($p=0,1501$, dokładny test Fishera).

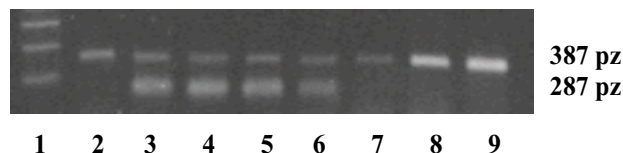
Ekspresję genu *NIS* porównano z typem histologicznym nowotworu. Obecność ekspresji genu *NIS* stwierdzono w 8 z 18 przypadków sklasyfikowanych jako raki brodawkowate (42%) i w 1 z 4 przypadków raka pęcherzykowego (25%). Ekspresja genu symportera towarzyszyła głównie rakom brodawkowatym (8 z 9 przypadków ze stwierdzoną ekspresją genu *NIS*). Nie znaleziono jednak zależności statystycznej między ekspresją tego genu a typem histologicznym nowotworu ($p=0,6161$, dokładny test Fishera).

Następnie poszukiwano zależności pomiędzy ekspresją genu symportera a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji TNM. Dane dotyczące ekspresji genu *NIS* w zależności od parametrów klasyfikacji TNM zebrano w tabeli I. Analiza powyższych wartości dokładnym testem Fishera nie wykazała istotnej zależności między ekspresją genu *NIS* a wielkością guza, zajęciem okolicznych węzłów chłonnych czy obecnością przerzutów odległych.

Tabela I

Ekspresja genu symportera w zależności od parametrów klasyfikacji TNM.

	T1-T2		T3		N0		N1a-N1b		M0		M1	
	p=0,6106				p=0,6570				p=0,1423			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>NIS</i> (+)	1	20,0	8	44,4	2	28,6	7	43,8	7	33,3	2	100
<i>NIS</i> (-)	4	80,0	10	55,5	5	71,4	9	56,2	14	66,7	0	0



Ryc.1

*Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji multiplex PCR. Ekspresja genu *NIS* jest obserwowana w przypadkach 3-6, przypadki 2 oraz 7-9 nie wykazują ekspresji tego genu. Wzorce długości fragmentów DNA - 1. Produkt o długości 387 pz odpowiada genowi β -aktywny, a produkt o długości 287 pz - genowi symportera.*

Korzystając z danych dotyczących jodochwytności raków sprawdzono, czy istnieje zależność między ekspresją genu symportera a zdolnością tkanki do wychwytu ^{131}I . Ekspresję genu symportera stwierdzono w 7 z 18 przypadków ocenionych jako jodochwytny (38,9%) i w 2 z 5 przypadków sklasyfikowanych jako niejodochwytny (40%). Analiza statystyczna wyników dokładnym testem Fishera nie wykazała istotnej zależności między tymi parametrami ($p=1,000$).

Dyskusja

Warunkiem powodzenia jodoterapii jest selektywny wychwyt ^{131}I z krwi przez komórki tarczycy, czy też w pewnych przypadkach przez przerzuty raków tarczycy. Tymczasem badania *in vitro* wykazały, iż wczesną cechą transformacji nowotworowej komórek tarczycy jest utrata zdolności do wychwytu jodu z krwi. Linie komórkowe nowotworów tarczycy ujawniły obniżony poziom ekspresji genu *NIS* lub jej brak [13].

Wg niektórych autorów [5] utrata jodochwytności na skutek braku lub niewystarczającej ilości symportera jest prawdopodobna dla raków pęcherzykowych (defekt transportu przez błonę bazolateralną). Obniżoną jodochwytność w rakach brodawkowatych wiąże się ze zmienionym transportem przez błonę apikalną [5]. Utratę ekspresji tego genu obserwowano natomiast w gruczolakach i rakach tarczycy [5,14].

W niniejszej pracy ekspresji genu *NIS* nie stwierdzono w 62,5% badanych tkanek sklasyfikowanych jako raki. Wśród przypadków ze stwierdzoną ekspresją tego genu 8 z 9 prób stanowiły raki brodawkowate. Nie wykazano jednakże istotności statystycznej między typem histologicznym nowotworu a ekspresją genu symportera. Z doniesień literaturowych wynika, iż utrata ekspresji genu *NIS* w tkance nowotworowej dotyczy wszystkich typów histologicznych, choć badania *in vitro* wskazują, że gen *NIS* jeśli ulega ekspresji, to właśnie w rakach brodawkowatych [15].

Istnieją doniesienia, że ekspresja genu *NIS* wiąże się z lepszym rokowaniem dla pacjenta [7], jednak

w niniejszej pracy nie wykazano zależności statystycznej między ekspresją badanego genu a którymkolwiek z parametrów klasyfikacji TNM. Podobnie nie znaleziono zależności między ekspresją genu *NIS* a płcią i wiekiem pacjenta.

Mimo że w niniejszej pracy 78,3% badanych tkanek sklasyfikowano jako jodochwytne, to jedynie 30,4% populacji była zarazem jodochwytna i wykazywała ekspresję genu symportera. Jak więc wyjaśnić zdolność do wychwytu jodu prawie 50% tkanek, skoro nie stwierdzono u nich ekspresji genu *NIS*? Niektórzy autorzy sugerują, że dla optymalnego efektu radioterapii konieczna jest ekspresja obu genów: *NIS* i *PDS* (genu kodującego inny przenośnik jodu zwany pendryną). Białko pendryny, jakkolwiek odpowiada za transport jodu, to jego lokalizacja w komórce (błona apikalna) wyklucza jego uczestnictwo w wychwycie jodu z krwi. Inny problem stanowi niejodochwytność ponad 8% przebadanych w pracy przypadków, w których stwierdzono ekspresję genu *NIS*. W świetle doniesień literaturowych istnieje kilka możliwości wyjaśnienia tego zjawiska. Tkankę zmienioną nowotworowo może cechować zupełny brak ekspresji genu *NIS* i ta sytuacja była możliwa do zweryfikowania w niniejszym doświadczeniu (badanie jakościowe). Częściej jednak poziom ekspresji tego genu ulega obniżeniu w stosunku do tkanki prawidłowej i tym zjawiskiem tłumaczy się obniżoną jodochwytność tkanki nowotworowej. Poziom ekspresji genu jest możliwy do oceny jedynie w badaniu ilościowym (real time PCR). Istnieje więc możliwość, że w tkankach sklasyfikowanych jako niejodochwytne poziom ekspresji genu *NIS*, choć stwierdzony, był za niski do efektywnego wychwytu jodu radioaktywnego z krwi.

Niektórzy badacze [8, 9] wskazują na przypadki, w których transformacji nowotworowej towarzyszy nadekspresja genu *NIS*, a mimo to tkanka taka jest niejodochwytna. Badania immunohistochemiczne wykazały jednak, że produkowane w nadmiarze białko *NIS* jest wówczas niewłaściwie zlokalizowane – w cytoplazmie zamiast w błonie podstawnej [8, 9]. Mimo ekspresji genu *NIS* syntetyzowane białko symportera może być nieprawidłowe na skutek mutacji, błędów w procesie transkrypcji (skrócone białko) czy modyfikacji potranslacyjnych (brak glikozylacji) [16].

Wnioski końcowe

W przeprowadzonych badaniach wstępnych nie stwierdzono zależności między ekspresją genu *NIS* a wiekiem i płcią pacjenta, typem histologicznym i zaawansowaniem klinicznym nowotworu wg klasyfikacji TNM.

Jakościowa ocena ekspresji genu symportera nie jest wystarczająca do określenia jodochwytności tkanki. Do pełnej oceny należy wykonać badania

ilościowe ekspresji tego genu oraz badania poziomu i lokalizacji białka symportera w komórce.

Piśmiennictwo

1. Smanik PA, Ryu KY, Thiel KS. Cloning of the human iodide symporter. *Biochem. Biophys Res Commun* 1996; 226: 339-345
2. Smanik PA, Ryu Y, Thiel KS. Expression, exon-intron organisation and chromosome mapping of the human iodide symporter. *Endocrinology* 1997; 138: 3555-3558
3. Arturi F, Lacroix L. Presta Regulation by Human Chorionic Gonadotropin of Sodium/Iodide Symporter Gene Expression in the JAr Human Choriocarcinoma Cell Line. *Endocrinology* 2002; 143: 2216-2220
4. Elisei R, Vivaldi A, Pacini F. Biology and clinical application of the *NIS* gene. *Tumori* 2003; 89: 523-528
5. Gerard AC, Daumerie C, Mestdagh C. Correlation between the loss of thyroglobulin iodination and the expression of thyroid-specific proteins involved in iodine metabolism in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4977-83
6. Petrich T, Helmeke J, Meyer GJ. Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med* 2002; 29: 842-854
7. Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpcao LV. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Lett* 2003; 8: 85-91
8. Czarnocka B, Pastuszka D, Łyczkowska A. Ekspresja symportera sodowo-jodowego (*NIS*) i peroksydazy tarczycowej (*TPO*) w rakach tarczycy rozwiniętych z komórek nabłonkowych tarczycy. *Endokrynologia Polska* 2003; 4: 501
9. Saito T, Endo T, Kawaguchi A. Increased expression of the sodium iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1998; 101: 1296-1300
10. Kordek R, Jassem J, Krzakowski M. *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy*. Wyd. Medical Press Gdańsk 2003
11. Schipper ML, Weber A, Behe M. Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1333-1338
12. Chomczyński P, Sacchi N. Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159
13. Trapasso F, Iuliano R, Chiefari E. Iodide symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells. *Eur J Endocrinol* 1999; 140: 447-451
14. Bidart JM, Mian C, Lazar V. Expression of pendrin and the pendred syndrome (*PDS*) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2028-2033
15. Arturi F, Russo D, Bidart JM. Expression pattern of the pendrin and sodium iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 129-135
16. Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/ iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol* 2004; 165: 25-34