

ИЗМЕНЕНИЕ КОПИЙНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ - ПРЕДИКТИВНЫЙ МАРКЕР МЕТАСТАЗОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Татимов М.З., Гудуева Е.Н., Маслов А.А.

ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Рак желудка характеризуется высокой летальностью, при этом метастазы возникают у 80-90% больных. В связи с этим поиск потенциальных молекулярных маркеров, пригодных для раннего прогнозирования возникновения метастазов является актуальной задачей. Выполнен анализ относительной копиюности 20 генетических локусов, ответственных за апоптоз, онкогенез, пролиферацию и окислительное фосфорилирование методом Real-Time qPCR в 30 образцах тканей желудка (опухолевых и условно здоровых): 9 пациентов с метастазами в лимфатических узлах и 21 пациента без метастазов. Полученные данные позволили выделить генетические локусы - *OCT4*, *MTDNA*, *CASP3* и *CFLAR* - которые можно использовать в качестве предиктивных маркеров при прогнозировании развития метастазов у пациентов с диагнозом рак желудка. Анализ данных показал высокую прогностическую ценность соотношения генетических локусов *p53/MDM2* для оценки вероятности развития метастазов.

Ключевые слова: копиюность генов, рак желудка, метастазы, апоптоз, энергетический метаболизм.

COPY NUMBER VARIATION OF GENETIC LOCI - A PREDICTIVE MARKER OF METASTASIS IN STOMACH CANCER PATIENTS

Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Tatimov M.Z., Gudueva E.N., Maslov A.A.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Stomach cancer has a high mortality rate, with metastases occur in 80-90% of patients. Therefore search for potential molecular markers that are suitable for early prediction of metastasis is an actual problem. Analysis of relative copy number of 20 genetic loci responsible for apoptosis, tumorigenesis, cell proliferation and oxidative phosphorylation of 60 gastric tissue samples (tumor and apparently healthy) from 9 patients with lymph node metastases and 21 patients without metastases was performed by Real-Time qPCR. The obtained data allowed to identify genetic loci - *OCT4*, *MTDNA*, *CASP3* and *CFLAR*, which can be used as predictive markers in forecasting the metastasis development in patients diagnosed with stomach cancer. Data analysis showed a high predictive value of *p53/MDM2* genetic loci ratio to assess the likelihood of metastasis development.

Keywords: copy number of gene, stomach cancer, metastases, apoptosis, energy metabolism.

По данным ВОЗ рак желудка характеризуется высокой летальностью: у мужчин более 460 тыс. человек в год, и у женщин – более 270 тыс. человек в год [6]. Метастазы возникают у 80-90 % больных раком желудка, при этом выживаемость составляет 65% в случае ранней диагностики заболевания и менее 15% на поздних стадиях процесса [9]. Поэтому исследования механизмов канцерогенеза необходимы для поиска потенциальных молекулярных маркеров, пригодных для ранней диагностики и прогнозирования течения заболевания.

Раковые клетки получают возможность выживать в организме за счет изменения в сигнальных путях, обеспечивающих приобретение автономной регуляции постоянного клеточного роста; иммортализации, нечувствительности к сигналам, ингибирующим клеточную пролиферацию; резистентность к сигналам апоптоза; неограниченного потенциала к пролиферации; способности поддерживать ангиогенез; способности к инвазии

и метастазированию. Молекулярные изменения, ответственные за приобретение вышеуказанных свойств, могут использоваться в качестве онкомаркеров [2].

Изменение копийности генов (Copy Number Variation или CNV) является одним из основных механизмов контроля раковой клеткой ключевых для выживания и малигнизации экспрессии генов. Копийность генов – вид генетического полиморфизма, возникающий в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. Результатом вариации может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена, и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена – белка или не кодирующей РНК [2]. CNV представляют собой критические генетические события, которые способствуют развитию и прогрессированию злокачественных новообразований у человека. CNV является одним из основных механизмов контроля экспрессии потенциальных онкогенов и генов-супрессоров опухолей раковыми клетками [2].

Анализ литературы позволяет сделать заключение о том, что значение CNV в качестве фактора малигнизации тканей ранее было недооценено. Так, в работе Günther T. и соавт. [4] изучена амплификация гена *MDM2* при раке желудка и показано, что увеличение копийности этого гена коррелирует с увеличенной экспрессией белка MDM2 и понижением экспрессии белка p53. Ген *MDM2* локализован на хромосоме 12 и считается негативным регулятором функции белка p53. MDM2/P53 путь является важной составной частью канцерогенеза. В работах Y-D Wang и соавт. [10] рассмотрена роль транскрипционного фактора *OCT4* в опухолеобразовании при аденокарциноме желудка. Ими установлено повышение экспрессии гена *OCT4* в опухолевых клетках по сравнению с прилегающими условно здоровыми тканями, тканями атрофического гастрита и желудочной язвы, а также то, что это изменение происходит совместно с изменением экспрессии генов *SOX2*, *NANOG* и *C-MYC*.

Точная характеристика числа копий генов определяет возможность создания предиктивных маркеров малигнизации тканей. Поэтому целью нашего исследования стало исследование относительной копийности генетических локусов, ответственных за апоптоз, онкогенез, пролиферацию и окислительное фосфорилирование в тканях опухолевых и здоровых тканей желудка пациентов с метастазами в лимфатических узлах и без метастазов.

Материалы и методы

Клиническим материалом для исследования послужили ткани (опухолевые и условно здоровые) 30 пациентов Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом рак желудка: с наличием метастазов в лимфоузлы (9 пациентов) и без метастазов (21 пациент). Образцы тканей были получены в процессе хирургического вмешательства в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте (РНИОИ) с 2013 по 2015 гг. Все

пациенты, вошедшие в данное исследование, имели ECOG статус от 0 до 2. Для верификации образцов тканей проводилось стандартное патолого-морфологическое исследование с окрашиванием фиксированных срезов гематоксилин-эозином. Биоптаты тканей после проведения патолого-морфологического исследования классифицировали на две группы: опухолевые (малигнизированные) и контрольные (не малигнизированные) образцы.

Геномную ДНК экстрагировали из свежзамороженных операционных биоптатов тканей желудка с использованием лизирующего SDS- содержащего буфера в присутствии протеиназы-К и последующей фенол-хлороформной экстракцией [2, 3]. Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флюориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США). Для проведения Real-Time qPCR концентрацию образцов ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл.

Определение относительной копииности генетических локусов проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). Принцип метода заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референтного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении дозы гена делается на основании анализа соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсной последовательностей [2]. Метод использует относительную количественную оценку интересующего гена в сравнении с референсным геном. Относительная величина определялась методом $\Delta\Delta C_t$ [7]. Каждые 25 мкл ПЦР-смеси для анализа содержали 10 нг геномной ДНК, 0.2 mM dNTP's, по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референтного гена (*B2M*) или гена-мишени, 2.5 mM MgCl₂, ПЦР-буфер, 0.05u/μl SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия). В качестве красителя использовали SYBR®Green I (Invitrogen, США). Амплификация каждой из проб осуществлялась в трех повторностях. Первичные данные RT-qPCR получали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager ver 3.1.

Количественная RT-PCR амплификация проводилась с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA) в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе: 95 °C 3 мин., и 40 циклов при 95 °C 10 сек, 58 °C 30 секунд (чтение оптического сигнала FAM для красителя SYBR®Green I) и 72°C 15 секунд. Показатели относительной копииности выбранных для исследования генетических локусов были получены методом количественной Real-Time PCR с использованием разработанной нами панели праймеров (таблица 1). Прямые и обратные праймеры были разработаны с использованием референтных последовательностей ДНК NCBI GenBank. Генетический локус *B2M* [2] использовали в качестве референтного для нормализации полученных показателей количественной RT-qPCR.

Панель праймеров для определения относительной копийности генов

№№	Наименование	№№ NCBI GenBank	Хромосомная локализация
1.	HV2_Hum34	NC_012920.1	mitochondrion
2.	B2M	NM_004048.2	15q21-q22.2
3.	GAPDH	NM_002046.5	12p13
4.	BAX	NM_138761.3	19q13.3-q13.4
5.	GSTP1	NM_000852.3	11q13
6.	CASP3	NM_004346.3	4q34
7.	CASP8	NM_001080125.1	2q33-q34
8.	HIF1 α	NM_001530.3	14q23.2
9.	OCT4 (POU5F1)	NM_001285987.1	6p21.31
10.	C-MYC	NM_002467.4	8q24.21
11.	SOX2	NM_003106.3	3q26.3-q27
12.	BCL2	NM_000633.2	18q21.3
13.	CFLAR	NM_003879.5	2q33-q34
14.	NANOG	NM_024865.2	12p13.31
15.	P53	NM_000546.5	17p13.1
16.	CASP9	NM_032996.3	1p36.21
17.	IL10	NM_000572.2	1q31-q32
18.	MKI67	NM_002417.4	10q26.2
19.	MDM2	NM_002392.5	12q13-q14
20.	NFKB1	NM_003998.3	4q24

Усредненные данные по каждому генетическому локусу нормировались по усредненному показателю референтного гена *B2M* для получения величины ΔCt ($\Delta Ct = Ct(\text{исследуемого гена}) - Ct(B2M)$). Относительную копийность генетического локуса (**RQ**) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct}$. Далее вычисляли медиану [1] $RQ_{\text{оп}}$ опухолевых образцов и медиану $RQ_{\text{к}}$ контрольных (условно нормальная ткань) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копийности генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани желудка: $RQ_{\text{оп}}/RQ_{\text{к}}$ [2].

Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни [1] для порогового уровня статистической значимости $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Сравнение относительной копийности генетических локусов в опухолевой и условно-здоровой ткани пациентов без метастазов в лимфоузлы показало статистически достоверное ($p < 0.05$) снижение относительной копийности генов *OCT4* и *MTDNA* на 50% и 30% соответственно в опухолевой ткани относительно условно здоровой (Рисунок 1). Ген *OCT4* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении

недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. Нокдаун гена *OCT4* вызывает дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека [2]. Обнаруженное снижение его копийности в опухолевой ткани желудка у пациентов без метастазов в лимфоузлы отличается от данных литературы [10] и может свидетельствовать об особом молекулярном статусе опухолей желудка из данной выборки.

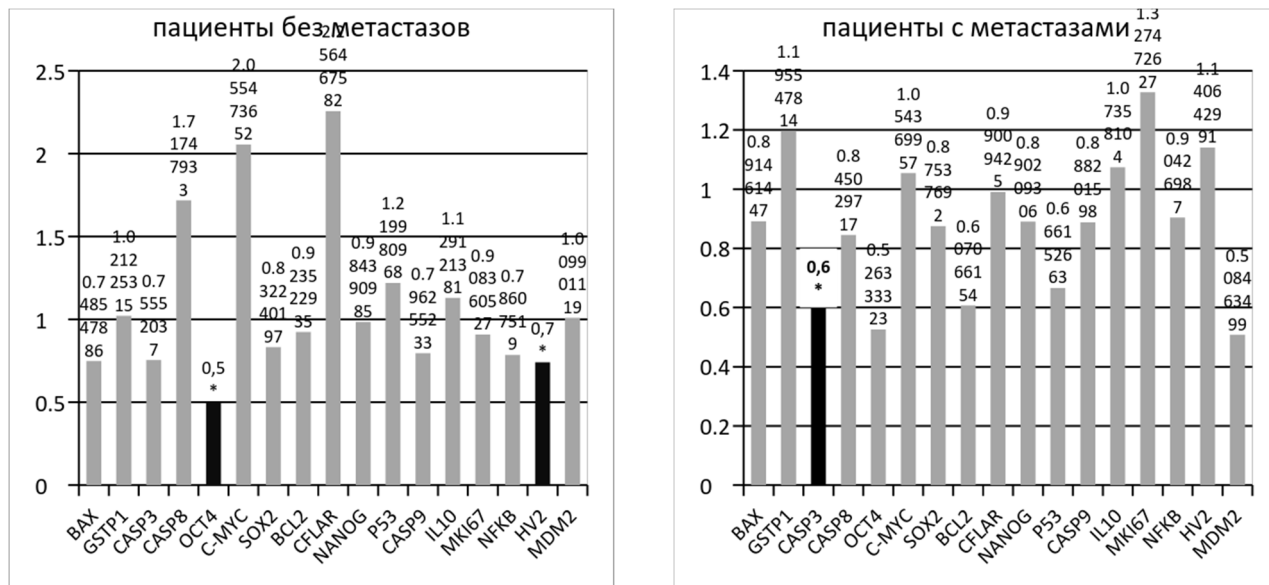


Рис. 1. Отношение копийности генов в опухолевой ткани желудка к условно нормальной у пациентов с метастазами и без метастазов в лимфоузлах

Обнаруженное снижение относительной копийности митохондриальной ДНК (мтДНК) находит подтверждение в данных литературы [8]. Подобное изменение числа копий митохондриальных генов, характерное для раковых клеток, ингибирует окислительное фосфорилирование, осуществляемое в митохондриях, и изменяет состояние биоэнергетики малигнизированных клеток, переводя клетки в режим преимущественного использования гликолиза (анаэробный режим). Это объясняет так называемый эффект Варбурга [8]. Количество копий мтДНК в клетке может служить индикатором интенсивности процессов окислительного фосфорилирования в силу своей пластичности. Полученные нами данные хорошо подтверждают факт угнетения процессов окислительного фосфорилирования в малигнизированных тканях желудка, оцениваемое по уменьшению относительной копийности митохондриальной ДНК (оцениваемое по локусу HV2).

Аналогичное сравнение копийности генетических локусов в опухолевой и условно-здоровой ткани пациентов с метастазами в лимфоузлах показало статистически достоверное ($p < 0.05$) снижение копийности гена *CASP3* на 38% в опухолевой ткани относительно условно здоровой (рисунок 1). Снижение копийности гена *CASP3* может свидетельствовать о

высоком потенциале к ингибированию эффекторной фазы апоптоза в клетках опухолей, дающих метастазы в лимфоузлы.

Так же было проведено сравнение копийности генов в опухолевой ткани пациентов с метастазами относительно копийности генов в опухолевой ткани пациентов без метастазов (Рисунок 2). Было обнаружено достоверное снижение копийности гена *CFLAR* на 50% ($p < 0,05$) и достоверно увеличение относительной копийности mtDNA на 90% ($p < 0,05$). Ген *CFLAR* кодирует белок регулятор апоптоза и структурно похож на каспазу-8, тем не менее, у кодируемого белка отсутствует активность каспазы, и он действует как ингибитор апоптоза [5].

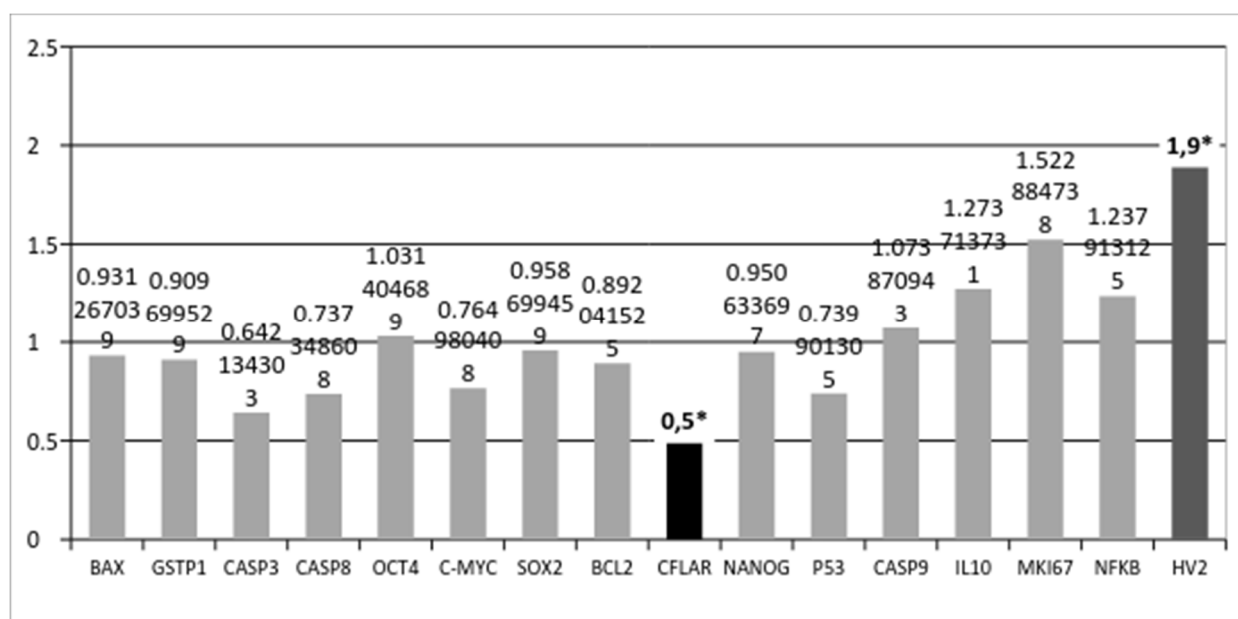


Рис. 2. Отношение копийности генов в опухолевой ткани желудка у пациентов с метастазами к копийности генов в опухолевой ткани желудка у пациентов без метастазов в лимфоузлах

Более низкая копийность гена *CFLAR* в метастазирующей опухоли может свидетельствовать о менее выраженной способности к ингибированию апоптоза, чем в не метастазирующей опухоли, а, следовательно, существует вероятность более высокой интенсивности апоптических процессов в подобных опухолях по сравнению с неметастазирующими, но не по сравнению с нормальной тканью (копийность гена *CASP3* достоверно снижена в таких опухолях по сравнению с нормальной тканью (рисунок 1)).

Повышенная копийность митохондриальной ДНК (*HV2*) в опухолях желудка у пациентов с метастазами относительно опухолей у пациентов без метастазов может отражать особенности энергетического метаболизма данной ткани с повышенной интенсивностью процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях, переводящей клетки в аэробный режим для обеспечения их распространения из первичного очага в другие органы [8].

Особый интерес представляют данные полученные в результате сравнения копийности про- и антиапоптозных генов *p53* и *MDM2* в опухолевых и условно здоровых тканях желудка пациентов с метастазами и без метастазов (таблица 2). У группы пациентов без метастазов в нормальной и опухолевой ткани соотношение копийности генов *p53/MDM2* составляет 1.169 и 1.414 соответственно, что говорит о более высокой копийности гена *p53* по сравнению с копийностью гена его негативного регулятора *MDM2*. Противоположный результат получен для группы пациентов с наличием метастазов в лимфоузлах: у них в нормальной и опухолевой ткани желудка соотношение копийности генов *p53/MDM2* составляет 0.021 и 0.027 соответственно, причем данные значения достигаются за счет увеличения копийности гена *MDM2*, что свидетельствует о ярко выраженной отрицательной регуляции гена *P53* в этих клетках.

Таблица 2

Соотношение копийности про- и анти-апоптозных генов *p53* и *MDM2* в опухолевых и условно здоровых тканях желудка пациентов с метастазами и без метастазов в лимфоузлах

Тип ткани	Пациенты с метастазами			Пациенты без метастазов		
	CNV <i>p53</i>	CNV <i>MDM2</i>	<i>p53/MDM2</i>	CNV <i>p53</i>	CNV <i>MDM2</i>	<i>p53/MDM2</i>
Нормальная	0,299	14,514	0.021	0,221	0,189	1.169
Опухоль	0,199	7,380	0.027	0,270	0,191	1.414

Заключение

Таким образом, использование трех разных подходов в оценке копийности генов (соотношение копийности в опухолевой ткани относительно нормальной ткани желудка, соотношение копийности в опухолевой ткани у пациентов с метастазами относительно опухолевой ткани у пациентов без метастазов, соотношение копийности генов *p53/MDM2*) позволяет выделить генетические локусы (*OCT4* и *mtDNA*, *CASP3*, *CFLAR* и *mtDNA*), а также соотношение генетических локусов (*p53/MDM2*), которые можно использовать в качестве предиктивных маркеров при прогнозировании развития метастазов у пациентов с диагнозом рак желудка.

Список литературы

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. - Л., 1973.
2. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генетических локусов при раке желудка// Молекулярная биология. - 2015. - Т. 49, № 4. - С.

658-666.

3. Кит, О.И., Водолажский, Д.И., Кутилин, Д.С., Малейко, М.Л., Двадненко, К.В., Енин, Я.С., Гудуева, Е.Н., Ильченко, С.А. Относительная копияность апоптоз-регулирующих генов как показатель малигнизации тканей желудка//Успехи современного естествознания. – 2015. - №3. - С. 40-45.
4. Günther, T., Schneider-Stock, R., Häckel, C., Kasper, H.U., Pross, M., Hackelsberger, A., Lippert, H. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations. //A Mod Pathol. - 2000 – V.13(6) – P.621-626.
5. Ili, C.G., Brebi, P., Tapia, O., Sandoval, A., Lopez, J., Garcia, P., Leal, P., Sidransky, D., Guerrero-Preston, R., Roa, J.C. Cellular FLICE-like inhibitory protein long form (c-FLIPL) overexpression is related to cervical cancer progression.// Int J Gynecol Pathol. – 2013. - V.32(3). - P.316-22.
6. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. Global cancer statistics// Cancer Journal for Clinicians. – 2011. - V.61(2). - P. 69-90.
7. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. //Methods. – 2001.- V.25. – P. 402-408.
8. Scatena, R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation.// Adv Exp Med Biol. - 2012. – V.942. – P.287-308.
9. Takuji G., Yanagisawa A., Sasako M. Ono H, Nakanishi Y., Shimoda T., Kato Y. Incidence in lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers.// Gastric Cancer. – 2000. – V.3. – P. 219-225.
10. Wang, Y-D., Cai, N., Wu, X-L., Cao, H-Z., Xie, L-L., Zheng, P-S. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway// Cell Death and Disease. – 2013. - V.4 - e760.

Рецензенты:

Франциянц Е.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

Горошинская И.А., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону.