

## ИЗМЕНЕНИЕ КОПИЙНОСТИ АПОПТОЗ-РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕНОВ И ГЕНА *KI67* В ПЕРВИЧНЫХ И РЕЦИДИВИРУЮЩИХ САРКОМАХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Кит О.И.<sup>1</sup>, Водолажский Д.И.<sup>1</sup>, Непомнящая Е.М.<sup>1</sup>, Алиев Т.А.<sup>1</sup>, Аушева Т.В.<sup>1</sup>, Андрейко Е.А.<sup>1</sup>, Тимошкина Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ (ФГБУ «РНИОИ»), Ростов-на-Дону, e-mail: n.timoshkina@mail.ru

Одним из механизмов изменения активности генов при малигнизации клеток служит изменение их копиюности (copy number variation - CNV). CNV приводит к возрастанию (при амплификации) или к снижению (при делециях) трансляции соответствующего белка. В настоящем исследовании в образцах злокачественных опухолей и соответствующих им биоптатах условно здоровых тканей, взятых у 32 пациентов с первичными и рецидивирующими саркомами мягких тканей (STS), была изучена относительная копиюность (RCQ) семи генов, участвующих в регуляции апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *P53*, *MDM2*), и гена *KI67*, экспрессия которого является традиционным маркером пролиферативной активности клеток. Амплификация гена *MDM2* была отмечена только в образцах липосарком из группы первичных опухолей, амплификация гена *KI67* – только в группе рецидивирующих STS. Исследованные группы сарком были эффективно дискриминированы с помощью RCQ для четырех генов *BAX*, *CASP8* ( $p < 0,01$ ) и *BCL2*, *CASP3* ( $p < 0,05$ ). Таким образом, показатели CNV исследованных генов могут играть значимую роль в процессах потенциального рецидивирования онкотрансформированных клеток сарком мягких тканей и, очевидно, способны стать полезными биомаркерами для прогноза течения этого заболевания.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей (STS), вариация числа копий генов (CNV), *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *P53*, *MDM2*, *KI67*, относительная копиюность генов (RCQ).

## COPY NUMBER VARIATIONS OF APOPTOSIS-REGULATING GENES AND *KI67* GENE IN PRIMARY AND RECURRENT SOFT TISSUE SARCOMAS

Kit O.I.<sup>1</sup>, Vodolazhsky D.I.<sup>1</sup>, Nepomnyashchaya E.M.<sup>1</sup>, Aliev T.A.<sup>1</sup>, Ausheva T.V.<sup>1</sup>, Andreyko E.A.<sup>1</sup>, Timoshkina N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: n.timoshkina@mail.ru

Copy number variation (CNV) is one of the mechanisms of changes in activity of genes associated with cell malignization. CNVs lead to an increase (in amplification) or decrease (in deletions) in the appropriate protein translation. Relative copy numbers (RCQ) of 7 genes involved in apoptosis regulation (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *P53*, *MDM2*) and *KI67* gene, which expression is a standard marker of proliferative activity of cells, were studied in samples of malignant and corresponding intact tissues obtained from 32 patients with primary and recurrent soft tissue sarcomas (STS). *MDM2* amplification was noted only in primary liposarcomas, *KI67* amplification was noted in recurrent STS. The studied groups of sarcomas were discriminated effectively using RCQ for 4 genes: *BAX*, *CASP8* ( $p < 0.01$ ) and *BCL2*, *CASP3* ( $p < 0.05$ ). Thus, CNVs of the studied genes can play an important role in potential recurrence of oncologically transformed cells of soft tissue sarcomas and, apparently, may become useful biomarkers for the disease prognosis.

Keywords: soft tissue sarcomas (STS), copy number variation (CNV), *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *P53*, *MDM2*, *KI67*, the relative copy number of genes (RCQ).

Саркомы мягких тканей (Soft Tissue Sarcomas - STS) – относительно редкие злокачественные опухоли мезенхимального происхождения, составляющие менее 1% всех солидных опухолей человека [11], но имеющие чрезвычайно разнообразную морфологию (более 50 гистологических подтипов). Около 11% сарком вообще не поддается классификации [6; 8]. На фоне сложной диагностики [2; 4; 8] научные исследования молекулярных маркеров STS дают материал для построения модели заболевания, расширяют

диагностические возможности и предлагают потенциальные цели для будущей таргетной терапии. На текущий момент принято считать, что до 30% сарком несут специфичные мутации генома [6].

Значительный вклад в изменчивость генома, в том числе при малигнизации тканей, вносят делеции и дупликации участков ДНК, объединяемые под общим названием вариации числа копий генов (CNV). Эти события существенно изменяют диплоидный статус генома. Они могут не иметь фенотипического эффекта, но могут лежать в основе онко-трансформации тканей. Приблизительно до 10% генома содержат CNV. В настоящее время размер CNV определяют как участки генома протяженностью более чем 50 п.н., тогда как более мелкие элементы считаются элементарными инсерциями или делециями. Вариабельность этих структурных элементов на порядок превышает величину вариабельности SNP [13].

Несмотря на быстрый прогресс в исследовании молекулярной патологии STS, остаются малочисленными сообщения, описывающие изменение CNV в этих опухолях. В частности, была установлена взаимосвязь между амплификацией ряда генов в хромосомных областях 1p, 14q, 15q, 22q и увеличением их экспрессии в гастроинтестинальных стромальных опухолях и лейомиосаркомах [12]. Применение метода NGS позволило провести широкомасштабное исследование STS [9] на панели, охватывающей полную кодирующую последовательность 194 генов. В результате были выявлены CNV в виде амплификации генов *MAP2K4*, *AURKA*, *AURKB* и *c-Myc*, а также случаи утраты копийности генов-онкосупрессоров *TP53* (24%), *PTEN* (16%) и *CDKN2A* (20%).

В настоящей работе мы исследовали относительную копийность (Relative Copy Quantitation - RCQ) семи генов, участвующих в регуляции апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *P53*, *MDM2*), и гена *KI67*, экспрессия которого является маркером пролиферативной активности клетки, в двух выборках пациентов: с впервые диагностированной опухолью и рецидивирующей саркомой мягких тканей.

### **Материалы и методы**

Клиническим материалом для исследования служили ткани (опухолевые и условно здоровые) 32 пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «РНИОИ» в 2014-2015 гг. по поводу саркомы мягких тканей (таблица 1). Медиана возраста пациентов составила 54 года (от 35 до 81 года). Каждый пациент подписал добровольное информированное согласие на участие в проведении исследования. Исследование проведено с соблюдением принципов ICH GCP.

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика пациентов

Характеристика	Переменные	Количество (%)	
		группа первичных опухолей	группа рецидивирующих опухолей
Клиническая классификация	T <sub>2a-2b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	16 (100)	0 (0)
	T <sub>2-3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>1</sub>	0 (0)	16 (100)
Гистологический тип опухоли	ЗФГ*	2 (12,5)	6 (37,5)
	липосаркома	4 (25)	0 (0)
	рабдо- и лейомиосаркомы	9 (56,3)	10 (62,5)
	шваннома	1 (6,2)	0 (0)
Стадия дифференцировки опухоли (G)	2	8 (50)	1 (6,2)
	3	8 (50)	15 (93,8)
Пол	женщины	12 (75)	10 (62,5)
	мужчины	4 (25)	6 (37,5)

Примечание: \* - злокачественная фиброзная гистиоцитома.

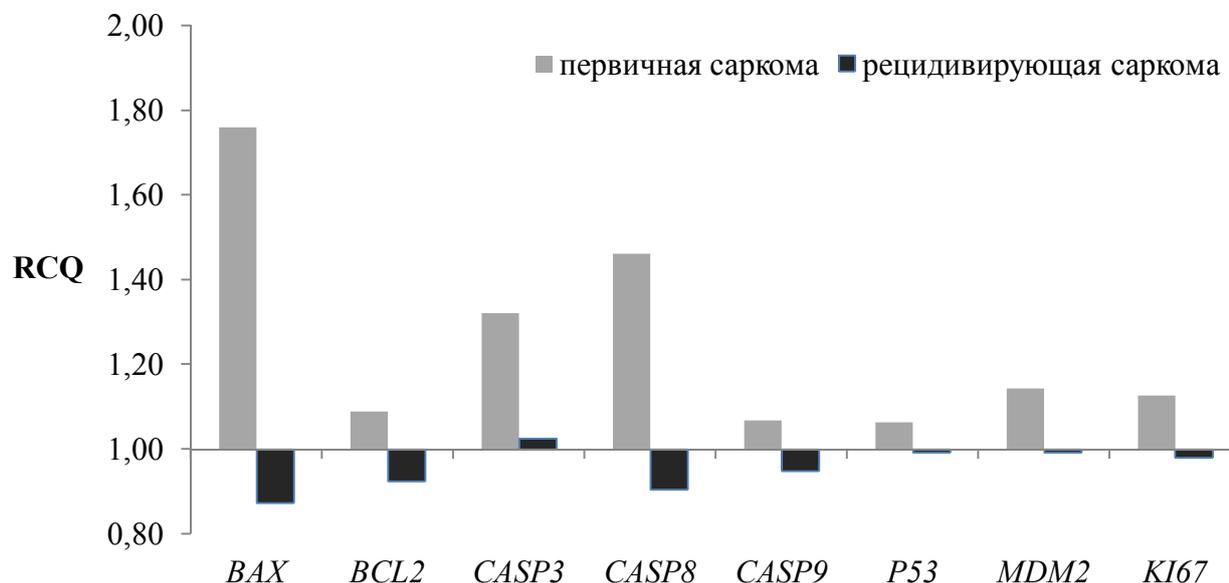
Гистологически оцененные образцы опухоли содержали не более 40% примеси нормальных клеток. Геномную ДНК экстрагировали из свежемороженых операционных биоптатов с использованием лизирующего SDS-содержащего буфера в присутствии протеиназы-К и последующей фенол-хлороформной экстракцией [3]. Постановку количественной RT-qPCR и расчёт относительной копийности генетического локуса (**RCQ**) осуществляли, как было описано ранее [1]. Для нормализации полученных показателей количественной RT-qPCR в качестве референсных использовали генетические локусы *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) и *ACTB*. Дозу исследуемого гена считали увеличенной или уменьшенной, если отношение  $RCQ_{\text{опухоль}}/RCQ_{\text{норма}}$  соответственно было  $\geq 1,5$  или  $\leq 0,6$ .

Для сравнения двух исследуемых групп пациентов были вычислены общие статистические показатели (медиана, вариация, дисперсия) и показатели, характеризующие статистически достоверные различия (U-критерий Манна-Уитни, коэффициент корреляции Спирмена, F-тест). Достоверность различий по частотным показателям определяли, используя  $\chi^2$ -тест. Все расчёты проведены с помощью программы Statistica v. 7.0 (Stat Soft Inc, 2004).

### Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетические маркеры интенсивно используют как для классификации сарком, так и для дифференцировки злокачественных и доброкачественных опухолевых образований мягких тканей [10]. Широкая гетерогенность гистотипов сарком сопровождается различным поведением опухолей от редко метастазирующих (например,

одиночные фиброзные опухоли) до крайне агрессивных и быстро метастазирующих (например, саркома Юинга). Полученные нами данные свидетельствуют об изменении копийности генов, связанных с регуляцией апоптоза и пролиферацией клетки, в зависимости от клинического поведения опухоли (рисунок и таблица 2).



*Изменение относительной копийности (RCQ) генов  
в первичных и рецидивирующих саркомах*

Согласно тенденции, отраженной на рисунке, первичные опухоли отличает общее увеличение амплификации генетических локусов, тогда как в рецидивирующих саркомах амплификации генетических локусов не наблюдается и даже преобладают процессы утраты про-апоптозных генов. При этом соотношение CNV про-апоптозного гена *BAX* и его антагониста *BCL2* в первичных саркомах составляет 1,62, а в рецидивирующих опухолях падает почти в 2 раза (до величины 0,94), что, возможно, отражает более мощное подавление апоптоза в агрессивных опухолях.

Корреляционный анализ также продемонстрировал разнонаправленные тенденции изменения CNV исследованных генов у пациентов из разных групп STS (таблица 2).

Таблица 2

Значения коэффициента корреляции Спирмена, вычисленные для показателей относительной копийности (RCQ) исследованных локусов, для групп первичных и рецидивирующих STS

	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CASP8</i>	<i>CASP9</i>	<i>P53</i>	<i>MDM2</i>	<i>KI67</i>
<i>BAX</i>	1,000	0,786	0,857	0,333	0,381	0,190	0,143	-0,167
<i>BCL2</i>	0,548	1,000	0,833	0,190	0,214	0,167	0,190	-0,190
<i>CASP3</i>	0,690	0,810	1,000	0,429	0,333	0,357	0,286	0,143

<i>CASP8</i>	0,190	-0,286	-0,143	<b>1,000</b>	0,667	<b>0,762</b>	<b>0,929</b>	<b>0,738</b>
<i>CASP9</i>	-0,214	0,095	-0,190	0,548	<b>1,000</b>	<b>0,881</b>	0,595	0,310
<i>P53</i>	-0,071	0,238	-0,048	0,429	<b>0,762</b>	<b>1,000</b>	<b>0,738</b>	0,524
<i>MDM2</i>	0,381	-0,310	0,024	-0,095	<b>-0,619</b>	-0,452	<b>1,000</b>	<b>0,714</b>
<i>KI67</i>	0,262	0,000	0,214	-0,500	<b>-0,810</b>	<b>-0,929</b>	0,476	<b>1,000</b>

Примечание: жирным шрифтом выделены значения корреляции, достоверные для  $p < 0,01$ . Группа данных, находящаяся выше значений 1,0 - значения коэффициента корреляции Спирмена, вычисленные для RCQ в группе первичных STS. Группа данных, находящаяся ниже значений 1,0 - значения коэффициента корреляции Спирмена, вычисленные для RCQ в группе рецидивирующих STS.

Для первичных сарком мягких тканей были показаны статистически достоверные положительные корреляции величин CNV эффекторной каспазы *CASP3* с антагонистами в регуляции апоптоза *BAX* и *BCL2* (коэффициенты корреляции Спирмена  $r = +0,857$  и  $+0,833$ , соответственно для  $p < 0,001$ ); инициаторной каспазы *CASP8* с генетическими локусами *P53*, *MDM2* и *KI67* ( $r = +0,762$ ;  $+0,929$  и  $+0,738$ , соответственно для  $p < 0,001$ ), *CASP9* - с *P53* ( $r = +0,881$ ;  $p < 0,001$ ). Кроме того, в этой группе однонаправленно изменялась относительная копияность генов *BAX* и *BCL2* ( $r = +0,786$ ;  $p < 0,001$ ).

Напротив, в рецидивирующих опухолях прослеживались многочисленные отрицательные ассоциации значений RCQ. Достоверно копияность маркера пролиферации *KI67* сопровождалась уменьшением относительной копияности инициаторной каспазы *CASP9* и «стража генома клетки» *P53* ( $r = -0,809$  и  $-0,929$ , соответственно для  $p < 0,001$ ), а также разнонаправленно изменялись значения RCQ генов *MDM2* и *CASP9* ( $r = -0,619$  для  $p < 0,01$ ). Положительными значениями корреляции были связаны изменения CNV генов *P53* - *CASP9* и *CASP3*- *BCL2* ( $r = +0,810$  и  $+0,762$ , соответственно для  $p < 0,001$ ).

Достоверно различающиеся изменения относительной копияности в группах первичных и рецидивирующих сарком были показаны при сравнении четырех из восьми исследованных локусов: *BAX*, *BCL2*, *CASP3* и *CASP8* (таблица 3).

Таблица 3

Изменение RCQ исследованных генов в первичных и рецидивирующих саркомах

Локус	RCQ		Значение U-коэффициента Манна-Уитни	Дисперсия RCQ		P (F-тест)
	первичные саркомы	рецидивирующие саркомы		первичные саркомы	рецидивирующие саркомы	
<i>BAX</i>	<b>1,76</b>	<b>0,87</b>	3,02; $p = 0,002$	<b>0,745</b>	<b>0,145</b>	0,003
<i>BCL2</i>	<b>1,09</b>	<b>0,92</b>	1,96; $p = 0,049$	<b>0,649</b>	<b>0,129</b>	0,004
<i>CASP3</i>	<b>1,32</b>	<b>1,02</b>	1,96; $p = 0,049$	0,127	0,114	0,834
<i>CASP8</i>	<b>1,46</b>	<b>0,90</b>	2,56; $p = 0,009$	<b>3,118</b>	<b>0,032</b>	$1 \times 10^{-12}$
<i>CASP9</i>	1,07	0,95	0,75; $p > 0,05$	0,537	0,227	0,106
<i>P53</i>	1,06	0,99	0,15; $p > 0,05$	<b>0,495</b>	<b>0,064</b>	0,0003
<i>MDM2</i>	1,14	0,99	1,51; $p > 0,05$	<b>4,108</b>	<b>0,016</b>	$1 \times 10^{-15}$
<i>KI67</i>	1,13	0,98	1,81; $p > 0,05$	0,066	0,094	0,505

Примечание: жирным шрифтом выделены значения RCQ, достоверно различающиеся согласно тесту Манна-Уитни, а также значения дисперсий RCQ, статистически достоверно различающиеся согласно F-тесту.

Сравнение дисперсий показателей RCQ выявило разный размах варьирования в исследованных группах (таблица 3). Большой разброс данных демонстрировала группа первичных сарком. Более того, согласно результатам F-теста дисперсия копийности в выборке рецидивирующих сарком статистически значимо была меньшей в пяти из восьми локусов: *BAX*, *BCL2*, *CASP8*, *P53*, *MDM2*. Исследованные группы пациентов различались и по частоте встречаемости CNV по исследованным локусам (таблица 4).

Таблица 4

Частота встречаемости изменений CNV исследованных генов в группах первичных и рецидивирующих сарком

Генетический локус	Частота, %		$\chi^2$ - тест	значимость, p
	первичные саркомы	рецидивирующие саркомы		
<i>BAX</i>	<b>62,5</b>	<b>25,0</b>	4,6	0,033
<i>BCL2</i>	50	37,5	0,6	0,476
<i>CASP3</i>	25	12,5	0,9	0,365
<i>CASP8</i>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	5,2	0,022
<i>CASP9</i>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	5,2	0,022
<i>P53</i>	<b>50</b>	<b>12,5</b>	5,2	0,022
<i>MDM2</i>	<b>37,5</b>	<b>0</b>	7,4	0,007
<i>KI67</i>	0	6,3	1,0	0,309

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверно различающиеся значения согласно данным  $\chi^2$ - теста.

Статистически достоверные изменения показателя CNV для гена *MDM2* были выявлены только в группе первичных сарком, тогда как единственный случай амплификации гена *KI67* был отмечен для рецидива STS. Увеличение копийности гена *MDM2*, как ингибитора гена *P53*, приводит к последующей сверхэкспрессии генетического локуса *MDM2* и к ингибированию *P53*-зависимой остановки клеточного цикла. В литературе описана амплификация хромосомы 12q13-15, где локализуется *MDM2*, как диагностический признак липосарком [4; 5]. В нашем исследовании также увеличение CNV данного гена обнаружено только в этом типе STS, вошедших в выборку первичных сарком.

### Заключение

Идентификация геномного дисбаланса, включающего амплификацию и потери различных регионов хромосом (CNV), внесла значительный вклад в повышение точности морфологической оценки опухолей мягких тканей, а также прогноза особенности поведения опухоли [5]. В упоминавшейся выше работе Yang и др. [9] специфичные профили CNV дискриминировали две морфологически близкие онкопатологии мягких тканей. Более того,

авторами была показана ассоциация CNV с контролем разных сигнальных путей, что подразумевает различные молекулярные механизмы, задействованные в канцерогенезе этих типов сарком. Полученные недавно данные о потере копияности генами-регуляторами сигнального пути Hippo (*NF2*, *SAVI* и/или *LATS2*), приводящей к активной клеточной пролиферации, характеризовало 39% опухолей мягких тканей [7], что, по мнению авторов, перспективно не только для молекулярной классификации, но и для разработки таргетной терапии некоторых подтипов STS: лейомиосаркомы, дедифференцированной липосаркомы, миксофибросаркомы и гигантоклеточных опухолей мягких тканей.

Возможно, в перспективе тестирование с помощью биомаркеров будет играть решающую роль в классификации опухолей мягких тканей. Используемые в этом качестве генетические изменения имеют важное преимущество - идентифицируются на ранних этапах онкотрансформации, а также в прогрессирующих, метастазирующих и ранее леченых опухолях. На фоне широко применяющегося в клинической практике FISH-метода и иммуногистохимического анализа для оценки STS-специфичных молекулярных изменений, метод RT-PCR имеет ряд преимуществ при использовании для тех же целей диагностики: большая объективность, простота, специфичность, возможность работать с замороженными биоптатами и FFPE-блоками, быстрота постановки, идентификация специфичных CNV. В дополнение к этому RT-PCR перспективна для обнаружения или мониторинга диссеминированных опухолей [5].

Проведенное исследование продемонстрировало статистически достоверное уменьшение копияности генов *BAX*, *BCL2*, *CASP3* и *CASP8* в рецидивирующих STS по сравнению с первичными опухолями, а также статистически значимые различия этих нозологических групп по частоте проявления CNV генов *BAX*, *CASP9*, *CASP8* и *P53*. Продемонстрирована эффективность использования показателя CNV для гена *MDM2* в качестве биомаркера липосаркомы, а также разнонаправленные тенденции в изменении относительной копияности генов в первичных и рецидивирующих саркомах. Полученные результаты могут быть использованы для разработки биомаркеров прогнозирования течения сарком мягких тканей.

### Список литературы

1. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Малейко М.Л., Двадненко К.В., Енин Я.С., Гудуева Е.Н., Ильченко С.А. Копийность генов *GSTP1*, *NFKB1* и локуса *HV2* митохондриальной ДНК при некоторых гистологических типах рака желудка // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1. – С. 918-921.

2. Кит О.И., Тодоров С.С. Гастроинтестинальные стромальные опухоли // Архив патологии. - 2012. - Т. 74. - № 4. - С. 63-65.
3. Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П. и др. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. - Ростов н/Д : ООО «Ростиздат», 2001. – 256 с.
4. Тодоров С.С., Кит О.И. Современное представление о морфогенетических особенностях липосарком // Архив патологии. - 2012. – Т. 74. – № 6. – С. 59-61.
5. Bridge J.A., Cushman-Vokoun A. Molecular diagnostics of soft tissue tumors // Arch Pathol Lab Med. - 2011. - V. 135. - P. 588–601.
6. Ducimetiere F., Lurkin A., Ranchere-Vince D. et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing // PLoS One. - 2011. - V. 6. - e20294.
7. Eisinger-Mathason T.S., Mucaj V., Biju K.M. et al. Deregulation of the Hippo pathway in soft-tissue sarcoma promotes FOXM1 expression and tumorigenesis // Proc Natl Acad Sci USA. - 2015. - V. 112 (26). - E3402-11.
8. Fletcher C., Bridge J.A., Hogendoorn P.C. et al. Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. - 4th edn. - IARC Press: Lyon. France, 2013.
9. Jour G., Scarborough J.D., Jones R.L. et al. Molecular profiling of soft tissue sarcomas using next-generation sequencing: a pilot study toward precision therapeutics // Human Pathology. - 2014. - V. 45. - P. 1563–1571.
10. Schmitz K., Schildhaus H.U. Molecular pathology of soft tissue tumors: Contribution to diagnosis and therapy prediction // Pathologe. - 2015. - V. 36 (2). - P. 126-136.
11. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2013 // A Cancer Journal for Clinicians. - 2013. - V. 63 (1). - P. 11–30.
12. Yang D., Yang A.Y.J., Hunt K. et al. An Integrated Study of Aberrant Gene Copy Number and Gene Expression in GIST and LMS // Technol Cancer Res Treat. - 2010. - V. 9 (2). - P. 171-177.
13. Zarrei M., MacDonald J.R., Merico D., Scherer S.W. A copy number variation map of the human genome // Nature Reviews Genetics. AOP. - 2015. - Doi: 10.1038/nrg3871 (дата обращения: 06.06.2016).