

ИЗМЕНЕНИЕ КОПИЙНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ ПРИ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ ЛЕГКОГО

Кутилин Д.С., Енин Я.С., Петрусенко Н.А., Водолажский Д.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru

В настоящее время проблема ранней диагностики рака легкого остается не решенной, а изученные на текущий момент молекулярные маркёры не обладают необходимой чувствительностью и специфичностью. В связи с этим поиск потенциальных молекулярных маркеров, пригодных для диагностики, планирования стратегии лечения и прогнозирования развития данного заболевания, является актуальной задачей. Выполнен анализ относительной копиюности 12 генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *P53*, *MDM2*), пролиферацию (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *PIK3* и *MKI67*), окислительное фосфорилирование (*HV2*) и ответ на гипоксию (*HIF1A1*) методом Real-Time qPCR в 60 образцах, содержащих опухолевые (30 образцов) и нормальные (30 образцов) клетки тканей легкого (препараты получены с помощью лазерной микродиссекции (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия)). Полученные данные позволили выделить генетические локусы - *BAX*, *p53*, *MDM2* и *HIF1A1* - которые имеют высокий потенциал в качестве молекулярных маркеров для диагностики рака легкого.

Ключевые слова: копиюность генов, рак легкого, лазерная микродиссекция, апоптоз, ангиогенез.

COPY NUMBER VARIATION OF GENETIC LOCI WITH MALIGNIZATION OF LUNG TISSUE

Kutilin D.S., Enin Y.S., Petrusenko N.A., Vodolazhsky D.I.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru

Nowadays the problem of early diagnosis of lung cancer remains unsolved, and currently investigated molecular markers do not possess the necessary sensitivity and specificity. In this regard, the search for potential molecular markers suitable for diagnosis, treatment strategy planning and forecasting development of this disease is an urgent task. Analysis of relative copy number of 12 genetic loci responsible for regulation of apoptosis (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *P53*, *MDM2*), cell proliferation (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *PIK3* and *MKI67*), oxidative phosphorylation (*HV2*) and response to hypoxia (*HIF1A1*) by Real-Time qPCR in 60 samples containing tumor (30 samples) and normal (30 samples) of lung tissue cells (preparations obtained using laser microdissection (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Germany)). The obtained data allowed to identify genetic loci - *BAX*, *p53*, *MDM2* and *HIF1A1*, which have a high potential as a molecular marker for the diagnosis of lung cancer.

Keywords: copy number of gene, lung cancer, laser microdissection, apoptosis, angiogenesis.

По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 1,8 млн новых случаев заболевания раком легкого и более 1,5 млн смертей от данной патологии, что делает её наиболее распространенной причиной смерти от рака [13]. В настоящее время проблема ранней диагностики рака легкого остается не решенной, а изученные на текущий момент молекулярные маркёры не показывают достоверной специфичности. Прогностическое значение многих из них спорно и, главным образом, отражает различия в методологии исследований, группах пациентов и интерпретациях. Прогностической ценностью обладают сигнатуры экспрессии определённых генов (например, *DUSP6*, *MMD*, *STAT1*, *ERBB3* и *LCK*) хотя сообщенные данные чрезвычайно гетерогенны. Трансформация клеток в раковые и опухолевая прогрессия связаны с накоплением изменений в геноме, что обеспечивает приобретение трансформированными клетками: неограниченного потенциала к

пролиферации; резистентности к сигналам апоптоза; способности поддерживать ангиогенез; способности к инвазии и метастазированию. Молекулярные изменения, ответственные за приобретение вышеуказанных свойств, могут использоваться в качестве онкомаркеров [15]. К подобным молекулярным онкомаркерам можно отнести специфические изменения числа копий генов [3].

Изменение числа копий гена (copy number variation, CNV) является одним из основных механизмов изменения степени экспрессии потенциальных онкогенов и генов-супрессоров опухолей раковыми клетками. CNV – 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 некодирующей РНК [5].

Начиная с 2004 года в многочисленных исследованиях были представлены данные о наличии множества субмикроскопических вариаций числа копий сегментов ДНК – класс, известный как структурные вариации. Внутри этого класса наибольшей компонентой являются вариации числа копий генов (CNV), которые включают в себя несбалансированные перестройки, увеличивающие или уменьшающие содержание ДНК. На сегодняшний день термином CNV обозначают фрагменты размером больше, чем 50 б.п.о., тогда как более мелкие элементы относят к вставкам или делециям [14]. Минимум 12% человеческого генома подвергается вариациям числа копий. Вклад CNV в вариативность генома сопоставим с вкладом однонуклеотидных полиморфизмов или даже превышает его [12]. Публикации последних лет показывают, что CNV являются следующим уровнем в полном понимании молекулярного контекста развития опухолевого процесса. Так, изучена роль CNV в качестве фактора малигнизации тканей желудка: в работе Günther T. и соавт. [9] показано, что увеличение копийности гена *MDM2* коррелирует с увеличенной экспрессией белка MDM2 и понижением экспрессии белка p53.

Исследование копийности генов может расширить представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе малигнизации тканей легкого, и обеспечить данными, необходимыми для формирования панели новых высокоспецифичных онкомаркеров, которые можно будет использовать для предиктивной диагностики, планирования стратегии лечения и прогнозирования развития заболевания. Поэтому целью нашего исследования стало изучение механизмов малигнизации тканей легкого на примере изменения относительной копийности генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *P53*, *MDM2*), пролиферацию (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *PIK3* и *MKI67*),

окислительное фосфорилирование (*HV2*) и ответ на гипоксию (*HIF1A1*) для выявления высокоспецифичных онкомаркеров.

Материалы и методы

Клиническим материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE-блоков 30 пациентов Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом «рак легкого» (аденокарцинома, степень дифференцировки G3, без мутаций в гене *EGFR*). Срезы толщиной 3 мкм фиксировались на предметных стеклах, покрытых полиэтиленом (Polyethylene Naphthalate (PEN)-membrane), подвергались депарафинизации (о-ксилолом) и окрашивались гематоксилином-эозином. Из окрашенных препаратов с помощью лазерной микродиссекции (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия) выделялись опухолевые и нормальные клетки, из которых фенол-хлороформным методом проводилась экстракция ДНК.

Определение относительной копийности 12 генетических локусов (*BAX*, *HIF1A*, *OCT4*, *SOX2*, *BCL2*, *CFLAR*, *NANOG*, *P53*, *MDM2*, *HV2*, *PIK3* и *MKI67*) проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). Принцип метода заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референсного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении дозы гена делается на основании анализа соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсной последовательностей [3].

Количественная RT-PCR амплификация проводилась с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA) в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе: 95 °C 5 мин., и 40 циклов при 95 °C 10 сек, 58 °C 30 сек (чтение оптического сигнала FAM) и 72 °C 30 сек. Каждые 20 мкл ПЦР-смеси для анализа содержали 2,4 нг геномной ДНК, 0.2 mM dNTP's, по 600 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени, 2.5 mM MgCl₂, 1X ПЦР-буфер, 0.1 у/μl SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия). В качестве красителя использовали EvaGreen®Dye (Biotium, 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.

Прямые и обратные праймеры были разработаны нами с использованием базы данных NCBI GenBank (табл. 1). Генетический локус *GAPDH* использовали в качестве референсного для нормализации полученных показателей количественной RT-qPCR.

Таблица 1

Панель праймеров для определения относительной копийности генов

№	Наименование гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
1.	HV2	GGG AGC TCT CCA TGC ATT TGG TA	AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGAATC
2.	GAPDH	GCT GAA CGG GAA GCT CAC T	GCA GGT TTT TCT AGA CGG CAG

3.	BAX	GCC TCC TCT CCT ACT TTG GG	AAA CAC AGT CCA AGG CAG C
4.	BCL2	GAG TGG GAT GCG GGA GAT G	GGT GAA GGG CGT CAG GTG
5.	HIF1 α	ACT GCA CAG GCC ACA TTC A	TGG GTG AGG AAT GGG TTC AC
6.	OCT4	TTT GTG CCA GGG TTT TTG GG	CTT CAC CTT CCC TCC AAC CA
7.	SOX2	TTT GTC GGA GAC GGA GAA GC	CCG GGC AGC GTG TAC TTA T
8.	CFLAR	GGC TCC CAG AGT GTG TAT GG	GGC CCT CTG ACA CCA CAT AG
9.	NANOG	TGC AAC CTG AAG ACG TGT GA	ACC AGA ACA CGT GGT TTC CA
10.	P53	GGT CGG TGG GTT GGT AGT TT	GTG TGG GAT GGG GTG AGA TT
11.	MK167	TGA GTC AGT GAA GAA AGA GTT GGA T	CCC CCT GTA AAC CAT CAG CA
12.	MDM2	TCT TTG GGA CCC ATC TAC CCT	AGA ATG CTT TAG TCC ACC TAA CCT T
13.	PIK3	GCT TGG GAG GAT GCC CAA T	GCT GTG GAA ATG CGT CTG GA

Усредненные данные по каждому генетическому локусу нормировались по усредненному показателю референсного гена для получения величины ΔCt ($\Delta Ct = Ct(\text{исследуемого гена}) - Ct(\text{GAPDH})$). Относительную копиюность генетического локуса (RQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct}$. Далее вычисляли медиану [2] $RQ_{\text{оп}}$ опухолевых образцов и медиану $RQ_{\text{к}}$ контрольных (нормальных) образцов для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копиюности генов в опухолевых клетках по отношению к нормальным клеткам ткани легкого: $RQ_{\text{оп}}/RQ_{\text{к}}$ [3].

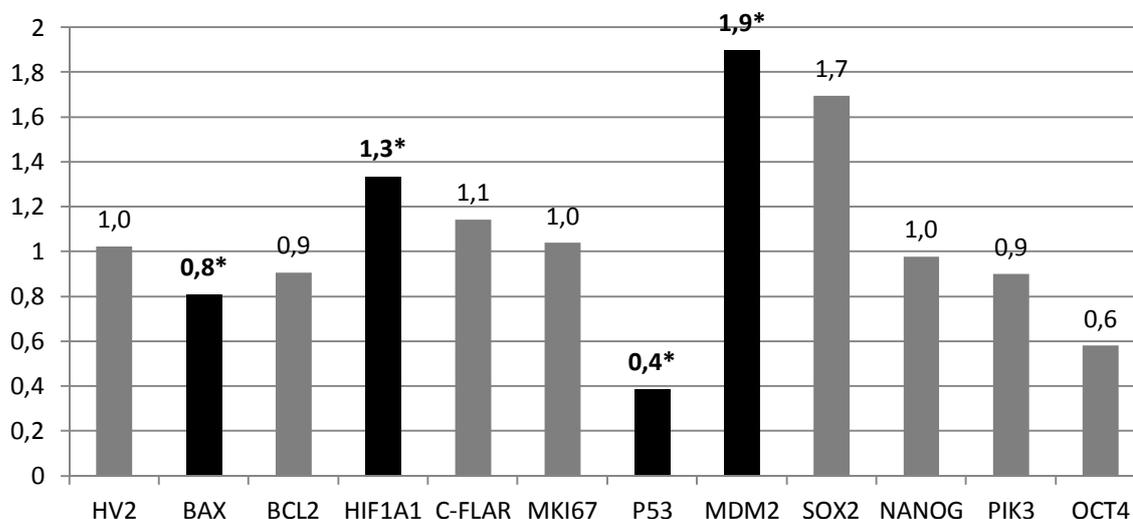
Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни [2] для порогового уровня статистической значимости $p < 0.05$, корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты и обсуждение

Сравнение относительной копиюности генетических локусов в опухолевых и нормальных клетках легкого показало статистически достоверное ($p < 0.05$) снижение копиюности гена *BAX* на 20% и гена *p53* на 60%, а также статистически достоверное ($p < 0.05$) увеличение копиюности генов *HIF1A1* и *MDM2* на 30% и 90% соответственно в опухолевых клетках относительно нормальных. Достоверного изменения копиюности других генетических локусов не обнаружено (рисунок).

Нарушение нормального функционирования MDM2/P53 пути является неотъемлемой частью канцерогенеза. Известна важная роль изменения копиюности генов *p53* и *MDM2* в опухолевой трансформации тканей других органов, например желудка [9]. *p53* активируется при накоплении повреждений ДНК и запускает транскрипцию одной группы генов и репрессию другой, результатом которой является остановка клеточного цикла; при сильном стрессовом сигнале принимает участие в запуске апоптоза путём стимуляции рецепторов смерти, путём взаимодействия с *Bax*, путём активации *p53*-зависимого модулятора апоптоза *PUMA* [1]. Ген *MDM2* локализован на хромосоме 12 и считается негативным регулятором функции белка *p53*. *MDM2* подавляет его активность, катализируя перенос активированного

убиквитина с фермента группы E2 на белок p53, маркированный убиквитином белок p53 является субстратом для 26S протеасомы, которая осуществляет протеолиз молекул белка p53 [4].



Соотношение копийности генов в опухолевых клетках относительно нормальных клеток легкого. *- статистически достоверные отличия ($p < 0.05$)

В нашем исследовании было оценено изменение соотношения копийности пар про- и антиапоптозных генов - *p53/MDM2* и *BAX/BCL2* (табл. 2). В опухолевых клетках легкого обнаружено снижение соотношения копийности генов *p53/MDM2* в 3,6 раза по сравнению с нормальными клетками. Это может стать причиной изменения экспрессии данных генов в опухолевых клетках легочной ткани и нарушения p53-зависимой регуляции апоптоза.

Несмотря на описанное выше снижение копийности гена *BAX* в опухолевых клетках, соотношение копийности генов *BAX/BCL2* в опухолевых и нормальных клетках легкого практически не отличалось. Белок BAX взаимодействует с митохондриальной мембраной и индуцирует открытие митохондриальных потенциалзависимых анионных каналов, образует олигомерные поры в митохондриальной мембране, что приводит к высвобождению цитохрома c и других проапоптотических факторов из митохондрий [8]. BCL2 регулирует апоптоз, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны путем ингибирования проапоптозных белков Bax и Bak [11]. В ходе исследования обнаружено снижение силы корреляционных связей генов *BAX* и *BCL2* в клетках аденокарциномы легкого по сравнению с нормальными клетками легкого (табл. 2), что может явиться причиной нарушения функционирования системы генов *BAX/BCL2* на транскриптомном уровне.

Таблица 2

Соотношения копийности пар про- и антиапоптозных генов и их корреляционные взаимосвязи в опухолевых и нормальных клетках легкого

Название пар генов	Соотношение копийности генов		Коэффициент корреляции, <i>r</i>	
	нормальные клетки	опухолевые клетки	нормальные клетки	опухолевые клетки
<i>BAX/BCL2</i>	1,800	1,610	0,798	0,185
<i>p53/MDM2</i>	0,160	0,045	0,847	0,784

В большинстве солидных опухолей развиваются регионы гипоксии, так как рост этих опухолей опережает развитие их кровоснабжения. Для того чтобы выжить, опухолевые клетки выработали скоординированный набор ответов для адаптации к гипоксии [10]. Ген *HIF1A* играет существенную роль в этом процессе, он кодирует альфа-субъединицу индуцированного гипоксией фактора транскрипции-1 (HIF-1). HIF-1 является главным регулятором клеточного и системного гомеостатического ответа на гипоксию путем активации транскрипции генов, участвующих в энергетическом обмене, ангиогенезе, апоптозе. Повышение его транскриптомных и протеомных уровней наблюдается при многих онкологических заболеваниях, например при гепатоцеллюлярной карциноме и раке легких [6]. В солидных опухолях HIF-1 способствует выживанию и миграцию клеток, стимулирует ангиогенез и вызывает резистентность к лучевой и химиотерапии [7]. Обнаруженное в нашем исследовании увеличение копийности гена *HIF1A* в клетках аденокарциномы легкого может отражать повышение потенциала опухолевой ткани к метаболической адаптации к гипоксии и к распространению опухолевых клеток из первичного очага. Полученные данные способствуют лучшему пониманию механизмов активации HIF-1 в клетках и могут быть полезны при разработке новых терапевтических подходов для лечения онкопатологии.

Заключение

Обнаруженное в исследовании снижение копийности проапоптозных генов *BAX* и *p53* и увеличение копийности антиапоптозного гена *MDM2*, снижение соотношения *p53/MDM2* и корреляции *BAX/BCL2* может лежать в основе нарушения регуляции апоптоза, приводящего к его ингибированию в опухолевой ткани легкого. А повышение копийности гена *HIF1A1* в клетках опухоли может стимулировать ангиогенез и улучшать её метаболическую адаптацию к гипоксии. Таким образом, изменение копийности генов *BAX*, *p53*, *MDM2* и *HIF1A1*, соотношения копийности *p53/MDM2* и корреляции *BAX/BCL2* имеют высокий потенциал в качестве молекулярных маркеров для прогнозирования течения и развития рака легкого.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00267 мол_а.

Список литературы

1. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция // Биохимия. - 2004. - Т. 69. – С. 1301-1313.
2. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. - Л., 1973.
3. 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.
4. Bouska A., Eischen C.M. Mdm2 affects genome stability independent of p53 // Cancer Res. - 2009. - V. 69 (5). – P. 1697-701.
5. Chen Z., Xu W.R., Qian H., Zhu W., Bu X.F., Wang S., Yan Y.M., Mao F., Gu H.B., Cao H.L., Xu X.J. Oct4, a novel marker for human gastric cancer // J. Surg. Oncol. - 2009. - V. 99 (7). - P. 414-9.
6. Cheng C.W., Chen P.M., Hsieh Y.H., Weng C.C., Chang C.W., Yao C.C., Hu L.Y., Wu E., Shen C.Y. Foxo3a-mediated overexpression of microRNA-622 suppresses tumor metastasis by repressing hypoxia-inducible factor-1 α in ERK-responsive lung cancer // Oncotarget. - 2015. - V. 6 (42). - P. 44222-38.
7. Chen S., Sang N. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells // J. Cell Biochem. - 2016. - V. 117 (2). - P. 267-78.
8. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. - 1999. - V. 341. - P. 233-249.
9. 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.
10. Koh M.Y., Spivak-Kroizman T.R., Powis G. HIF-1 alpha and cancer therapy. Recent Results // Cancer Res. - 2010. - V. 180. - P. 15-34.
11. Marzo I., Brenner C., Zamzani N. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis // Science. - 1998. - V. 281. - P. 2027-2031.
12. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H, Shapero M.H, Carson A.R, Chen W, Cho E.K, Dallaire S, Freeman J.L., González J.R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E. Global variation in copy number in the human genome // Nature. - 2006. - V. 444 (7118). - P. 444-54.

13. World Cancer Report 2014. Chapter 1.1. World Health Organization. 2014. ISBN 9283204298.
14. Zarrei M., MacDonald J. R., Merico D., Scherer S.W. A copy number variation map of the human genome // Nature Reviews Genetics. - 2015. - V. 16 (3). - P. 172-83.
15. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation // J. Clin. Pathol. - 2006. - V. 59 (8). - P. 790-800.