

КОПИЙНОСТЬ 17-ТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ АДЕНОКАРЦИНОМА ЖЕЛУДКА

Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н., Маслов А.А., Колесников Е.Н., Татимов М.З.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: dvodolazski@gmail.ru

Изменение числа копий участков ДНК (CNV), как полиморфизм генома, играет важную роль в канцерогенезе желудка. Целью настоящего исследования была оценка изменения относительной копиинности 17-ти генетических локусов в образцах опухолевой и условно нормальной ткани желудка 47-ми пациентов с диагнозом аденокарцинома без признаков метастатического поражения регионарных лимфоузлов (n=18) и с регионарными метастазами (n=29). Согласно полученным данным выделены гены с редко встречающейся aberrантной копиинностью (частота менее 10 %): (*P35*, *MDM2*, *MET*, *S6K2*<*PIK3CA* <*IRX1* <*AURKA*), и гены с aberrантной копиинностью с частотой встречаемости более 10 % (*HER2*<*NFKB*<*C-MYC*, *POU5F1B*<*CCND1*<*OCT1*<*HV2*). Для двух локусов (*APC* и *GKNI*) не удалось выявить изменений числа копий в опухоли. Два ядерных локуса (*NFKB* и *POU5F1B*) продемонстрировали статистически значимые различия при дискриминации групп с локализованной и местнораспространенной формами рака желудка (OR=8,95, 95 % CI: 1,04-77,37, P<0,05). Таким образом, амплификация *NFKB* и *POU5F1B* генов может быть ассоциирована с развитием метастазов в регионарных лимфатических узлах.

Ключевые слова: изменение числа копий генов, аденокарцинома желудка, метастазы.

COPYNUMBER VARIATION OF 17 GENES IN THE GASTRIC ADENOCARCINOMA

Vodolazhsky D.I., Timoshkina N.N., Maslov A.A., Kolesnikov E.N., Tatimov M.Z.

Rostov Research Oncology Institute, Rostov-on-Don, e-mail: dvodolazski@gmail.com

The copy number variation (CNV) is common polymorphism of the genome, plays an important role in carcinogenesis of the stomach. The purpose of this study was to assess the change in the relative copy-size of 17 genetic loci in samples of tumor and conditionally normal gastric tissue in 47 patients with adenocarcinoma without metastatic regional lymph nodes (n = 18) and regional metastases (n = 29). According to the data obtained, genes with a rare aberrant copy (frequency less than 10 %) are identified: (*P35*, *MDM2*, *MET*, *S6K2* <*PIK3CA* <*IRX1* <*AURKA*), and genes with aberrant copying with a frequency of more than 10 % (*HER2* <*NFKB* <*C-MYC*, *POU5F1B* <*CCND1* <*OCT1* <*HV2*). For two loci (*APC* and *GKNI*), it was not possible to detect CNV-changes in the tumor. Three nuclear loci (*C-MYC*, *NFKB* and *POU5F1B*) showed statistically significant differences in the discrimination of groups with localized and locally advanced forms of gastric cancer (OR = 8.95, 95 % CI: 1.04-77.37, P < 0.05). Thus, amplification of *C-MYC*, *NFKB* and *POU5F1B* genes can be associated with the development of metastases in regional lymph nodes.

Keywords: CNV, adenocarcinoma, gastric cancer, metastases.

Варьирование числа копий участков ДНК человека (Copynumbervariation – CNV) относится к одному из видов полиморфизма, встречающемуся в нормальных клетках в процессе дифференцировки и функционирования, и затрагивающего, по меньшей мере, 10 % генома. Исследования последних лет свидетельствуют о важной роли aberrантных изменений CNV в онкогенезе [10]. Накопление CNV-событий в онкотрансформированных клетках может служить селективным фактором преимущества по сравнению с нормальными клетками тканей. В ряде работ были выявлены потери проапоптотических генов в образцах раковых опухолей желудка и одновременно противоположный процесс – амплификация генов, связанных с ростом, делением и метастазированием [1, 8].

Всё больше фактов свидетельствует о том, что CNV могут стать информативными биомаркерами для ранней диагностики рака желудка, последующего контролирования течения заболевания и эффективности терапии, а также служить маркерами таргетной химиотерапии. Кроме того, предложено использовать CNV для молекулярного субтипирования рака желудка [6, 7]. Не менее важной задачей является поиск прогностических маркеров метастазирования, так как 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 [12].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении числа копий генетических локусов в неопластических опухолях желудка, как без признаков метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, так и с метастазами в них. Относительную копиюность (RCQ) определяли для 16-ти генов ядерной локализации – участников ключевых сигнальных путей, регулирующих рост клетки, выживание, метастазирование и устойчивость к химиотерапии, и некодирующего локуса митохондриальной ДНК (*HV2*), потеря копиюности которой является наиболее распространенным событием при неоплазиях различной локализации.

Материалы и методы

Клиническим материалом для исследования относительной копиюности генов служили ткани (опухолевые и условно здоровые) 47-ми пациентов Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы G2-G3 (Таблица 1), проходивших плановое лечение в ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ. Медиана возраста составила 67 лет (от 36 до 83 лет). Образцы тканей были получены в процессе хирургического вмешательства в период с 2015 по 2016 г. Все пациенты, вошедшие в данное исследование, имели ECOG статус от 1 до 2. Для работы с биоптатами пациентов были получены добровольные информированные согласия, в соответствии с этическим регламентом проведения медико-биологических исследований.

По клинической классификации заболевания были сформированы две группы пациентов: группа T₃₋₄N₀M₀ с локализованной формой опухоли (n=18) и группа T₃₋₄N₁₋₂M₀ с местнораспространенной формой рака желудка (n=29). 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.

Клинико-морфологическая характеристика пациентов

Характеристика	Переменные	Количество (%)
Клиническая классификация	T ₃₋₄ N ₀ M ₀	18 (38%)
	T ₃₋₄ N ₁₋₃ M ₀	29 (62%)
Стадия дифференцировки опухоли (G)	2	24 (51%)
	2-3	12 (26%)
	3	11 (24%)
Пол	женщины	14 (30%)
	мужчины	33 (70%)
Возраст, лет	<60	11 (23%)
	≥60	36 (77%)

Геномную ДНК экстрагировали из свежемороженых операционных биоптатов тканей желудка с использованием лизирующего SDS-содержащего буфера в присутствии протеиназы-К и последующей фенол-хлороформной экстракцией [2]. Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) AssayKit (Invitrogen, США).

Для определения дозы гена (RCQ) проводили ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Прямые и обратные праймеры были разработаны с использованием соответствующих референсных последовательностей NCBI GenBank в программе Primer-BLAST. Каждые 25 мкл ПЦР-смеси содержали 10 нг геномной ДНК, 0,2mM dNTP's, по 600 нМ прямого и обратного праймеров, 2,5 mM MgCl₂, ПЦР-буфер, 0,05u/μl ДНК-полимеразы *Thermusaquaticus* («Синтол», Россия). В качестве красителя использовали EvaGreen (Biotium, США). Амплификацию каждой из проб осуществляли в трех повторностях. Количественную RT-qPCR проводили с использованием термоциклера CFX96 (Bio-Rad, США) 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 EvaGreen) и 72 °C 15 секунд. Первичные данные RT-qPCR получали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1). Генетический локус *GAPDH* использовали в качестве референсного для нормализации полученных показателей количественной RT-qPCR.

Относительную копиюность генетического локуса (RCQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta C_t}$. Дозу исследованного локуса считали равной диплоидному набору (2n), если отношение $RCQ_{\text{опухоль}}/\text{норма} \sim 1$. Если отношение $RCQ_{\text{опухоль}}/\text{норма}$ было $\geq 1,5$ или $\leq 0,5$, дозу локуса считали увеличенной ($\geq 3n$) или уменьшенной ($\leq 1n$), соответственно.

Статистический анализ проводили с помощью непараметрических критериев в программах Statisticav.7 и SPSSStatistics 19.

Результаты исследования и их обсуждение

Для всех вошедших в исследование пациентов были получены данные по копийности 17-ти генетических локусов. В целом, 33 образца неоплазий желудка (70 %) продемонстрировали амплификацию и/или потерю хотя бы по одному локусу. Среднее значение локусов амплифицированных и/или с потерей в группе T₃₋₄N₀M₀ (без регионарных метастазов) составило 1,06±0,83 на одного пациента, а в группе T₃₋₄N₁₋₃M₀ (с регионарными метастазами) – 2,14±2,2.

Выявлено aberrантное изменение RCQ 14-ти исследованных генов хромосомной локализации, за исключением *APC* и *GKN1* (рисунок 1).

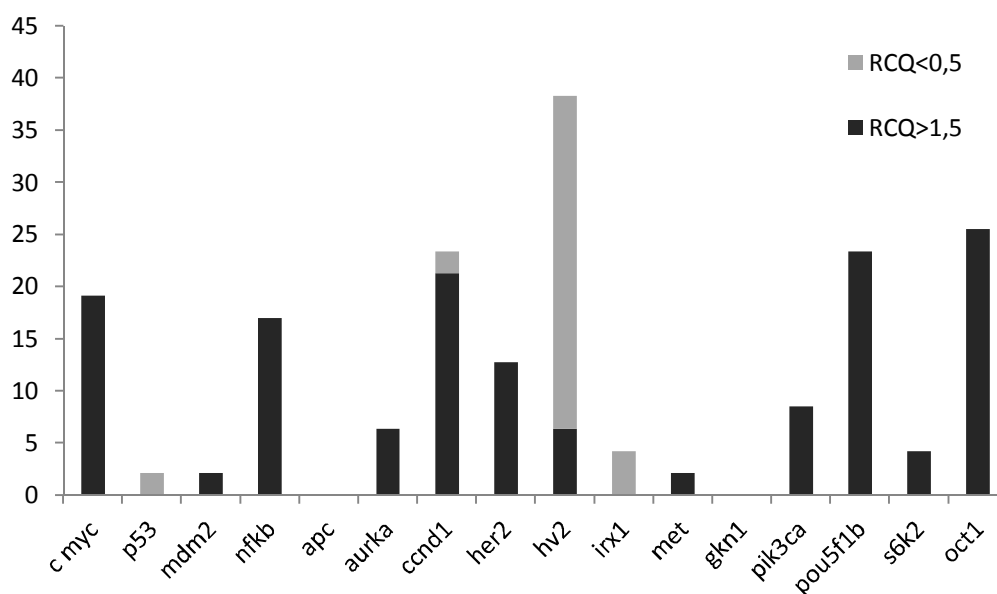


Рис. 1. Частота амплификаций и потерь 16-ти генетических локусов в образцах аденокарциномы желудка

Потеря копийности зафиксирована для двух генов-онкосупрессоров (*IRX1* и *P53*). Напротив, для 11-ти онкогенов было характерно увеличение относительной копийности, тем не менее в одном образце опухоли с регионарными метастазами была отмечена потеря копийности локуса *CCND1*, кодирующего белок циклин D1. Наиболее частыми CNV-изменениями в образцах аденокарциномы желудка стало уменьшение копийности локуса мтДНК *HV2* в 15-ти случаях (32 %), кроме этого в трёх случаях *HV2* был амплифицирован по сравнению с неопухолевым тканью желудка (рисунок 1).

Распределение случаев aberrантного изменения RCQ по локусам в исследованной выборке в зависимости от ряда клинико-патологических показателей приведено в таблице 2.

Таблица 2

Клинико-морфологические характеристики и частота aberrантных RCQ в исследованных локусах

Локус	Возраст			Пол			G			N-классификация		
	<60, (%)	>60, (%)	P*	мужчины, (%)	женщины, (%)	P	G2, (%)	G2-3, (%)	P	N0, (%)	N1-3, (%)	P
<i>C-MYC</i>	1(9)	8(22)	0,595	6(18)	3(21)	0,883	2(8)	7(30)	0,056	1(6)	7(24)	0,099
<i>P53</i>	0	1(3)	0,526	1(3)	0	0,655	1(4)	0	0,982	0	1(3)	0,807
<i>MDM2</i>	0	1(3)	0,526	1(3)	0	0,655	0	1(4)	0,983	0	1(3)	0,807
<i>NFKB</i>	1(9)	7(19)	0,734	7(21)	1(7)	0,453	3(13)	5(22)	0,649	0	7(24)	0,047
<i>AURKA</i>	1(9)	2(6)	0,775	2(6)	1(7)	0,607	0	3(13)	0,070	0	3(10)	0,425
<i>CCND1</i>	2(18)	8(22)	0,893	10(30)	0	0,053	5(21)	5(22)	0,779	4(22)	6(21)	0,808
<i>HER2</i>	2(18)	4(11)	0,921	3(9)	3(21)	0,490	4(17)	2(9)	0,703	1(6)	5(17)	0,433
<i>HV2</i>	5	13(36)	0,838	13(39)	5(36)	0,928	8(33)	10(44)	0,678	8(44)	10(35)	0,708
<i>IRX1</i>	2(18)	3	0,713	4(12)	1(7)	0,991	2(8)	3(13)	0,959	1(6)	4(14)	0,405
<i>MET</i>	0	1(3)	0,526	1(3)	0	0,655	1(4)	0	0,982	0	1(3)	0,807
<i>PIK3CA</i>	1(9)	3(8)	0,890	3(9)	1(7)	0,724	1(4)	3(13)	0,570	1(6)	3(10)	0,480
<i>POU5F1B</i>	1(9)	10(28)	0,382	9(27)	2(14)	0,626	3(13)	8(35)	0,074	1(6)	10(35)	0,045
<i>S6K2</i>	1(9)	1(3)	0,956	2(6)	0	0,879	0	2(9)	0,451	0	2(7)	0,692
<i>OCT1</i>	4(36)	8(22)	0,585	11	1(7)	0,129	6(25)	6(26)	0,803	4(22)	8(28)	0,947
N	11	36		33	14		24	23		18	29	

Примечание: * – вероятность в χ^2 -тесте.

Статистический анализ данных выявил тенденцию влияния пола на частоту изменения числа копий гена *CCND1* ($P=0,053$), все 10 случаев aberrантных RCQ_{ccnd1} были определены у мужчин. В качестве тенденции также определена ассоциация амплификации двух локусов *AURKA* и *POU5F1B* с низкой степенью дифференцировки (G3) опухоли ($P=0,070$ и $P=0,074$, соответственно). Дискриминация групп с локализованной формой опухоли (T₃₋₄N₀M₀) и местнораспространенной формой рака желудка (T₃₋₄N₁₋₃M₀) возможна по двум исследованным ядерным локусам *NFKB* и *POU5F1B* ($\chi^2= 5,10$ и $5,18$, соответственно, $P<0,05$). В группе T₃₋₄N₁₋₃M₀ частота амплификации гена *NFKB* составила 24 %, гена *POU5F1B* – 34 %, тогда как в группе T₃₋₄N₀M₀ изменений RCQ локуса *NFKB* не было зафиксировано, а амплификация *POU5F1B* отмечена в 6 % опухолей (OR=8,95, 95 %CI: 1,035-77,37, $P<0,05$). Потенциально для идентификации местнораспространенной формы рака желудка возможно использование ещё одного онкогена *C-MYC*, амплификация которого также преобладала в группе T₃₋₄N₁₋₃M₀ ($\chi^2=2,72$, $P=0,099$).

Корреляционный анализ полученных данных выявил статистически достоверные ассоциации между амплификацией трёх локусов *C-MYC*, *NFKB*, *POU5F1B* и метастазированием в региональные лимфоузлы ($p=0,026$; $0,009$; $0,009$, соответственно), а также степенью дифференцировки опухоли ($p=0,042$; $0,014$; $0,016$, соответственно).

Отметим, что в группе T₃₋₄N₁₋₃M₀ статистически достоверно коррелировала амплификация генов *C-MYC* и *POU5F1B* (R=0,609, p<0,01), локализованных рядом на 8q24 хромосоме.

Ранее нами обсуждалось снижение числа копий митохондриальной ДНК (мтДНК), оцениваемое по RCQ локуса *HV2*, в различных гистологических типах рака желудка относительно нормальных клеток и по мере потери дифференцировки опухоли [1]. Тенденция снижения числа копий мтДНК, как отражение известного эффекта Варбурга – перехода малигнизированных клеток в режим преимущественного использования гликолиза [9], отражена и в настоящем исследовании, однако данный маркер не дискриминировал опухоли с метастазами в регионарные лимфоузлы. Тем не менее частота снижения числа копий *HV2* в группе с локализованной формой опухоли составила 44 % против 28 % в группе с местнораспространенной формой рака желудка. Кроме того, в последней присутствовали два случая амплификации локуса *HV2*. Полученная тенденция согласуется с описанным повышением копийности мтДНК в опухолевых тканях у пациентов с метастазами, что может отражать особенности энергетического метаболизма, переводящей клетки в аэробный режим для обеспечения их распространения из первичного очага в другие органы [9].

Одной из основных задач исследования CNV генома является выявление нарушения баланса онкогенов и онкосупрессоров, которые вызывают функциональные нарушения в клетке, способствующие её малигнизации. Согласно литературным данным охарактеризованы изменения копийности множества генов в опухолях различного происхождения. Отметим однако, что оценки встречаемости изменения копийности одного и того же гена часто значительно разнятся. Так, приводимые частоты амплификации онкогена *HER2*, ассоциированного, как правило, с плохим прогнозом заболевания, варьируют от 6 до 23 % от числа исследованных случаев рака желудка [7]. Вклад в вариативность оценок, по-видимому, могут вносить как методы и схема исследования, так и популяционная принадлежность пациентов. Например, в двух недавних работах методами PCR-RT и FISH оценивалась копийность другого онкогена *MET*, который считают перспективным в качестве мишени для таргетной терапии при раке желудка. Относительно высокая частота амплификации гена *MET* (21,8 %) была определена группой Haetal. [3], исследовавших пациентов этнических корейцев (n=495). В работе Janijisiaetal. [5], изучавших пациентов западных регионов США (n=38), амплификации *MET* не было обнаружено, несмотря на повышенную экспрессию мРНК и белка в 63 % и 50 % случаев, соответственно.

В нашей работе не были идентифицированы образцы опухолей с aberrантной копийностью генов *APC* и *GKN1*, что может быть обусловлено и недостаточной численностью выборки для идентификации редких событий, и популяционным составом

выборки пациентов (европеоиды), а также ограничениями при формировании групп сравнения (отбирали опухоли с инвазией всех слоев желудка – T₃₋₄). Экспрессия гена *GKN1*, недавно идентифицированного мощного супрессора опухоли желудка, значительно падает в большинстве метаплазий и раковых опухолях [15]. Однако механизмы негативной регуляции активности *GKN1* изучены недостаточно, рассматривается участие в этом процессе, как уменьшение копий гена, так и инактивирующие мутации и гиперметилирование промотора.

В целом, выявленные нами частоты aberrантных RCQ в злокачественных опухолях желудка T₃₋₄N₀₋₃M₀ в большинстве случаев согласуются с данными более ранних исследований. Условно генетические локусы, вошедшие в настоящую работу, можно разделить на группу, показатели aberrантной относительной копийности которых редко изменяются при малигнизации (частота менее 10 %), такие как – *P35*, *MDM2*, *AURKA*, *IRX1*, *MET*, *PIK3CA*, *S6K2*, и на группу, показатели RCQ которых чаще изменяются при малигнизации тканей желудка, такие как – *C-MYC*, *NFKB*, *CCND1*, *HER2*, *HV2*, *POU5F1B*, *OCT1*.

Два из 17-ти исследованных локусов продемонстрировали статистическую значимость для дискриминации групп T₃₋₄N₀M₀ и T₃₋₄N₁₋₃M₀-*NFKB* (чувствительность Se-88 %; специфичность Sp – 45 %) и *POU5F1B*(Se-91 %; Sp – 47 %); в отношении локуса *C-MYC* наблюдалась тенденция влияния на риск образования метастазов (чувствительность Se-78 %; специфичность Sp – 44 %). Ранее сообщалось о значительном увеличении числа копий гена *C-MYC* в процессе канцерогенеза [11], в том числе была показана тесная связь этого события с глубиной метастазов в лимфатических узлах и инвазией опухоли желудка [13]. Для гена *POU5F1B* с ещё не вполне описанными функциями была продемонстрирована связь увеличения числа копий и избыточной экспрессии при раке желудка, что в свою очередь, коррелировало с ростом опухоли [4]. Биологическое значение активации ядерного фактора-каппа-В (NF-каппаВ) в неопластических образованиях желудка человека неясно. Тем не менее была выявлена ассоциация активации NF-каппа В с канцерогенезом, агрессивностью опухоли желудка и инфекцией *H.pylori* с повышенной экспрессией MMP-9, IL-1beta и IL-8 [14].

В целом, обнаружение в опухоли желудка амплификации по одному из трёх описанных выше маркеров и/или изменение RCQ более чем по двум ядерным локусам, оцененным в настоящей работе, повышает риск метастазирования в регионарные лимфатические узлы в 6,9 раз (OR=6,933; 95 % CI:1.3-35.3; Se – 87 %, Sp – 52 %).

Заключение

Относительная копияность исследованных генетических локусов в опухолях желудка разных N-типов изменяется не одинаково. Для аденокарцином T₃₋₄N₁₋₃M₀, в отличие от аденокарцином T₃₋₄N₀M₀, характерна амплификация онкогенов *NFKB* и *POU5F1B*.

Список литературы

1. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копияности генетических локусов при раке желудка / О.И. Кит и [др.] // Молекулярная биология. – 2015. – Т.49. – № 4. – С. 658-666.
2. Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел / И.В. Корниенко [др.]. – Ростов-на-Дону: ООО «Ростиздат», 2001. – С.256.
3. Ha S.Y., Lee J., Kang S.Y. et al. MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas // Modern Pathology. – 2013. – V.26. – P. 1632–1641. doi:10.1038/modpathol.2013.108.
4. Hayashi H., Arao T., Togashi Y. et al. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer // Oncogene. – 2015. – V.34 (2). – P.199-208. doi: 10.1038/onc.2013.547.
5. Janjigian Y.Y., Tang L.H., Coit D.G. et al. MET expression and amplification in patients with localized gastric cancer // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2011. – V. 20. – P. 1021–1027.
6. Labots M., Buffart T.E., Haan J.C. et al. High-level copy number gains of established and potential drug target genes in gastric cancer as a lead for treatment development and selection. Cell Oncol 2014; 37: 41–52.
7. Liang L., Fang J-Y., Xu J. Gastric cancer and gene copy number variation: emerging cancer drivers for targeted therapy // Oncogene. 2015. V.35. P. 1475-1482. doi:10.1038/onc.2015.209.
8. Mauro J.A., Butler S.N., Ramsamooj M., Blanck G. Copy number loss or silencing of apoptosis-effector genes in cancer // Gene. – 2015. – V. 554. – P. 50–57.
9. Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation // AdvExp Med Biol. – 2012. – V.942. – P.287-308.
10. Shlien A., Malkin D. Copy number variations and cancer // Genome Medicine. – 2009. – N1- 62.
11. Sonoda A., Mukaisho K., Nakayama T. et al. Genetic lineages of undifferentiated-type gastric carcinomas analysed by unsupervised clustering of genomic DNA microarray data // BMC

Med Genomics. – 2013. – V. 6. – P. 25.

12. Takuji G., Yanagisawa A., Sasako M. et al. 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.

13. Wang X., Liu Y., Shao D. et al. Recurrent amplification of MYC and TNFRSF11B in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer // *Gastric Cancer*. – 2016. – V.19 (1). – P.116-27. doi: 10.1007/s10120-015-0467-2.

14. Wu C-S., Chen M-F., Lee I-L., Tung S-Y. Predictive Role of Nuclear Factor- κ B Activity in Gastric Cancer: A Promising Adjuvant Approach With Caffeic Acid Phenethyl Ester // *Journal of Clinical Gastroenterology*. – 2007. – 41(10): 894-900.

15. Yoon J.H., Choi W.S., Kim O., Park W.S. The role of gastrokine 1 in gastric cancer // *J Gastric Cancer*. – 2014. – V.14 (3). – P. 147-55. doi: 10.5230/jgc.2014.14.3.147.