

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ 15 ГЕНОВ В ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Кит О.И.¹, Пушкин А.А.¹, Росторгуев Э.Е.¹, Тимошкина Н.Н.¹, Кузнецова Н.С.¹, Кавицкий С.Э.¹, Нальгиев А.М.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: anton.a.pushkin@gmail.com

Глиомы – наиболее распространенные опухоли головного мозга. Частота встречаемости глиальных опухолей составляет около 5 случаев в год на 100 000 человек. Максимально возможная циторедукция улучшает выживаемость пациентов, однако вопрос дальнейшей терапии глиом остается актуальным. Одним из перспективных подходов может стать разработка эффективных терапевтических схем на основании молекулярно-ориентированных воздействий на опухоль. Целью настоящей работы было исследование относительной экспрессии 15 генов сигнальных путей, ассоциированных с онкотрансформацией клеток, в 54 образцах опухолей в сравнении со здоровой тканью мозга, генотипированных на наличие соматических мутаций в генах *IDH1/2* и *ATRX*. Случаев мутаций в генах *IDH2* и *ATRX* не выявлено. Мутация R132H гена *IDH1* была идентифицирована в 18,5% опухолей, достоверно отличавшихся от опухолей *IDH1* дикого типа по транскрипционной активности гена *SMAD7* ($p=0,012$). Аберрантный паттерн относительной экспрессии был характерен преимущественно для глиобластом G IV. По результатам исследования можно выделить группу молекулярных маркеров (*SMAD7*, *SMO*, *EGLN1/3*, *HIF1A*, *KDM1A*), с высокой частотой изменяющих транскрипционную активность в глиальных опухолях и перспективных для использования в таргетной терапии и дифференциальной диагностике.

Ключевые слова: глиомы, экспрессия генов, *IDH1/2*, *ATRX*.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF 15 GENES IN THE GLIAL TUMORS OF DIFFERENT DEGREE OF MALIGNANT

Kit O.I., Pushkin A.A.¹, Rostorguev E.E.¹, Timoshkina N.N.¹, Kuznetsova N.S.¹, Kavickiy S.E.¹, Nalgiev A.M.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: anton.a.pushkin@gmail.com

Gliomas are the most common brain tumors. The incidence of glial tumors is about 5 cases per year per 100 000 people. The maximum possible cytoreduction improves patient survival, but the issue of further treatment of gliomas remains relevant. One promising approach may be the development of effective therapeutic schemes based on molecular-oriented effects on the tumor. The purpose of this work was to study the relative expression of 15 genes of signaling pathways associated with oncotransformation of cells in 54 tumor samples in comparison with healthy brain tissue, genotyped for the presence of somatic mutations in the *IDH1 / 2* and *ATRX* genes. No cases of mutations in the *IDH2* and *ATRX* genes have been identified. The R132H mutation of the *IDH1* gene was identified in 18.5% of tumors that significantly differed from wild-type *IDH1* tumors in the transcriptional activity of the *SMAD7* gene ($p = 0.012$). The aberrant pattern of relative expression was predominantly characteristic of G IV glioblastomas. According to the study, a group of molecular markers (*SMAD7*, *SMO*, *EGLN1 / 3*, *HIF1A*, *KDM1A*) can be distinguished with a high frequency of altering transcriptional activity in glial tumors and promising for use in targeted therapy and differential diagnosis.

Keywords: gliomas, gene expression, *IDH1 / 2*, *ATRX*.

Современная классификация нейроэпителиальных опухолей Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) определяет три основные группы глиом, а именно астроцитомы, олигодендроглиомы и эпендимомы, и, кроме того, предполагает их четырехуровневую гистопатологическую оценку (grade I – IV). В обновленной классификации ВОЗ опухолей ЦНС (2016) учитывается не только фенотип, но и некоторые генетические характеристики

глиом. По литературным данным, несколько основных молекулярных изменений являются типичными для различных типов новообразований головного мозга. К ним относятся мутации в генах *IDH1* и *IDH2*, ассоциированных с диффузно инфильтрирующими глиомами, мутации в генах *TP53* и *ATRX*, характерные для астроцитом, ко-делеция 1p/19q и мутации промотора гена *TERT* в олигодендроглиомах, а также мутации или слияния *BRAF* в ограниченных астроцитомах, особенно у детей [1]. Выявление этих и некоторых других генетических аномалий в опухоли является клинически важным и может помочь врачам определить правильную стратегию лечения и предсказать прогноз.

Десятилетия молекулярных исследований глиом позволили выявить ключевые нарушения в экспрессии элементов молекулярных механизмов контроля внутриклеточных процессов, включая следующие: нарушение регуляции сигнальных путей факторов роста посредством активации генов, кодирующих рецепторные тирозинкиназы (receptor tyrosine kinases - RTKs); активация пути фосфатидилинозитол-3-ОН-киназы (phosphoinositide 3-kinases - PI3Ks); и инактивация путей подавления опухолей p53 и ретинобластомы [2]. Обнаружение новых изменений в экспрессии генов и их сопоставление с клиническим исходом формирует новые представления о геномном и эпигеномном ландшафте, биологических подгруппах глиом, что вселяет надежду на разработку эффективных стратегий лечения.

Целью настоящей работы было исследование экспрессии генов EGFR, TGF- β , SMO и HIF1A сигнальных путей, ассоциированных с онкотрансформацией глиальных клеток, в опухолях, генотипированных на наличие мутаций в генах *IDH1/2* и *ATRX*.

Материал и методы исследования. Методом сплошной текущей выборки было отобрано 54 пациента, проходивших лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России в 2017-2019 гг. по поводу глиальной опухоли головного мозга (табл. 1). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России; в каждом случае было получено добровольное информированное согласие больного на включение его в исследование. Возраст пациентов варьировал от 18 до 79 лет, медиана составила 58 лет. Согласно гистологической верификации в выборку глиальных опухолей вошли глиобластома (GIV), анапластическая астроцитома (GIII), диффузная астроцитома (GII).

В работе использованы операционные биоптаты опухоли (основная точка) и условно здоровой ткани головного мозга (контрольная точка), изъятые в процессе операционного вмешательства. Точки забора материала рассчитывали до операции с использованием навигационной станции Medtronic S7 (Medtronic, Ирландия). Контрольная точка локализовалась на расстоянии 15 мм от границы опухоли вне функционально значимой зоны головного мозга. Для визуализации опухоли пациенты за 2 часа до операции принимали 5-

аминолевулиновую кислоту в стандартной дозе. Контрольный биоптат при оценке модулем Blue 400 микроскопа Carl Zeiss OPMI PENTERO (Zeiss AG, Германия) был без активного свечения. Операционный материал замораживали и хранили при -80 °С.

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика пациентов

Характеристика	Переменные	Количество (%)
Клиническая классификация (WHO grade)	глиобластома (GIV)	29 (54%)
	анапластическая астроцитомы (GIII)	6 (11%)
	диффузная астроцитомы (GII)	19 (35%)
Пол	женщины	24 (44%)
	мужчины	30 (56%)
Возраст, лет	18-35	6 (11%)
	36-60	29 (54%)
	>61	19 (35%)

Фрагменты ткани гомогенизировали в TRIzol (Thermo Fisher, США) с помощью MagNA Lyser (Roshe, Швейцария). Нуклеиновые кислоты выделяли согласно инструкции производителя. Дополнительно проводили очистку препаратов ДНК и РНК соответственно с помощью набора ДНК-сорб-В («ИнтерЛабСервис», Россия) и набора miRNAsy mini Kit (Qiagen, Германия).

Полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы 1 (Thermo Fisher, США) для удаления геномной ДНК. Синтез кДНК на РНК-матрице проводили с использованием набора MMLV Reverta («Синтол», Россия). Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии 15 генетических локусов: *EGFR*, *SMAD4*, *SMAD7*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *HBP1*, *HIF1A*, *EGLN1*, *EGLN3*, *KDM1B*, *KDM1A*, *MSI1*, *MSI2*, *TET1*. В качестве референсных локусов использовали гены *PSMC*, *TBP* и *RPL0*. Предварительно для подбора референсных генов оценивали стабильность экспрессии 8 кандидатных локусов с помощью программы geNorm. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST [3]. Процедура расчета показателя относительной экспрессии (RCQ) соответствовала описанной ранее [4].

Наличие соматических мутаций в генах *IDH1* (R132H, R132C, R132S, R132G, R132L, R132V), *IDH2* (R172K, R172M, R172W, R172S, R172G) и *ATRX* (R1803H, R221K, R221M) определяли с помощью секвенирования по Сенгеру с использованием генетического анализатора AB 3500 (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ результатов выполняли с помощью пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Достоверность отличий определяли, вычисляя непараметрический критерий Манна–Уитни. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий отвергали при пороговом уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Из 54 пациентов мутантный статус гена *IDH1* (R132H) идентифицировали у 10 пациентов (18,5%). Случаев с мутацией в генах *IDH2* и *ATRX* не выявлено.

Сравнительный анализ уровня экспрессии в основной и контрольной точках продемонстрировал увеличение транскрипционной активности в глиальных опухолях головного мозга по десяти из 15 исследованных локусов (*EGFR*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *HIF1A*, *KDM1B*, *KDM1A*, *MSI1*, *MSI2*, *TET1*). Статистически достоверное увеличение подтверждено для трёх генов *SMO*, *HIF1A* и *KDM1A* соответственно в 1,5 (у 48% пациентов), 1,7 (у 57% пациентов) и 1,3 раза (у 33% пациентов). Для остальных локусов либо не отмечено различий при сравнении экспрессии в опухоли и условной норме (*SMAD4*), либо идентифицировано смещение транскрипции в сторону снижения уровня транскрипционной активности по сравнению с контрольной точкой. Для локусов *SMAD7*, *EGLN1* и *EGLN3* снижение показателя относительной экспрессии было статистически значимо ($p < 0,05$) соответственно в 1,7 раза (у 50% пациентов), 1,25 (у 31% пациентов) и 1,4 (у 45% пациентов).

Для оценки изменения уровня экспрессии в глиальных опухолях между 15 генетическими локусами был проведен корреляционный анализ, результаты которого представлены в таблице 2.

Таблица 2

Значения коэффициента корреляции Спирмена (r), вычисленные для показателей RCQ
15 локусов в исследованной группе глиом

	<i>EGFR</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMO</i>	<i>HBP1</i>	<i>EGLN1</i>	<i>EGLN3</i>	<i>KDM1B</i>	<i>KDM1A</i>	<i>MSI1</i>	<i>MSI2</i>
<i>EGFR</i>	1,000									
<i>SMAD4</i>	0,061	1,000								
<i>SMO</i>	0,611	-0,096	1,000							
<i>HBP1</i>	0,072	0,291	0,154	1,000						
<i>EGLN1</i>	-0,078	0,507	-0,048	0,346	1,000					
<i>EGLN3</i>	0,095	0,221	0,052	0,521	0,593	1,000				
<i>KDM1B</i>	0,053	0,178	-0,019	0,281	0,322	0,443	1,000			
<i>KDM1A</i>	0,416	0,420	0,414	0,227	0,158	0,230	0,144	1,000		
<i>MSI1</i>	0,340	0,119	0,625	-0,080	0,148	-0,046	-0,027	0,389	1,000	0,381

<i>MSI2</i>	0,367	0,309	0,263	0,230	0,333	0,179	0,153	0,519	0,381	1,000
<i>TET1</i>	0,038	0,451	-0,054	0,305	0,646	0,580	0,672	0,190	0,147	0,285

Примечание: жирным шрифтом выделены значения корреляции (r), статистически значимые для $p < 0,001$.

Продемонстрированы статистически достоверные положительные корреляции изменений относительной экспрессии как для локусов, функционирующих внутри одного сигнального пути - *EGLN1*, *EGLN3*, так и для локусов, участвующих в разных сигнальных путях – *EGFR*, *SMO*; *MSI1*, *SMO*; *EGLN1*, *SMAD4*; *HBP1*, *EGLN3*; *KDM1B*, *EGLN3*; *KDM1A*, *MSI2* (табл. 2). Увеличение относительной экспрессии гена *TET1* ассоциировано с возрастанием уровня экспрессии четырёх генетических локусов: *SMAD4*, *EGLN1*, *EGLN3* и *KDM1B*.

Значения RCQ были определены в трех группах глиом разного уровня злокачественности (Grade). Уровни транскрипционной активности исследованных генов по группам проиллюстрированы на рисунке 1.

В группе G II в 53% случаев выявлено увеличение в 1,5 раза экспрессии гена *KDM1A* ($p < 0,05$) (рис. 1). Ранее исследователи отмечали роль сверхэкспрессии *KDM1A* в активности глиальных стволовых клеток, что позволяет рассматривать в данном случае *KDM1A* в качестве потенциальной терапевтической мишени [5].

Статистически достоверных отличий относительной экспрессии исследуемых локусов в группе G III не выявлено.

Для группы G IV было характерно снижение относительной экспрессии ($p < 0,05$) трех генов *SMAD7*, *EGLN1* и *EGLN3* соответственно в 2,5 раза (62% случаев), 1,4 (31% случаев) и 1,4 (52% случаев) (рис. 1). Кроме того, в глиобластомах было выявлено увеличение в 1,4 раза относительной экспрессии ($p < 0,05$) гена *SMO* (45% случаев). *SMO*, как звено в сигнальном пути SHH, активирует транскрипционные Gli-факторы, которые в свою очередь индуцируют экспрессию генов-мишеней. Эктопическая передача сигналов через SHH связана с различными типами опухолей, включая медуллобластому, базальноклеточную карциному, рак молочной железы и рак легких, что делает этот путь и всех его участников привлекательными терапевтическими мишенями [6].

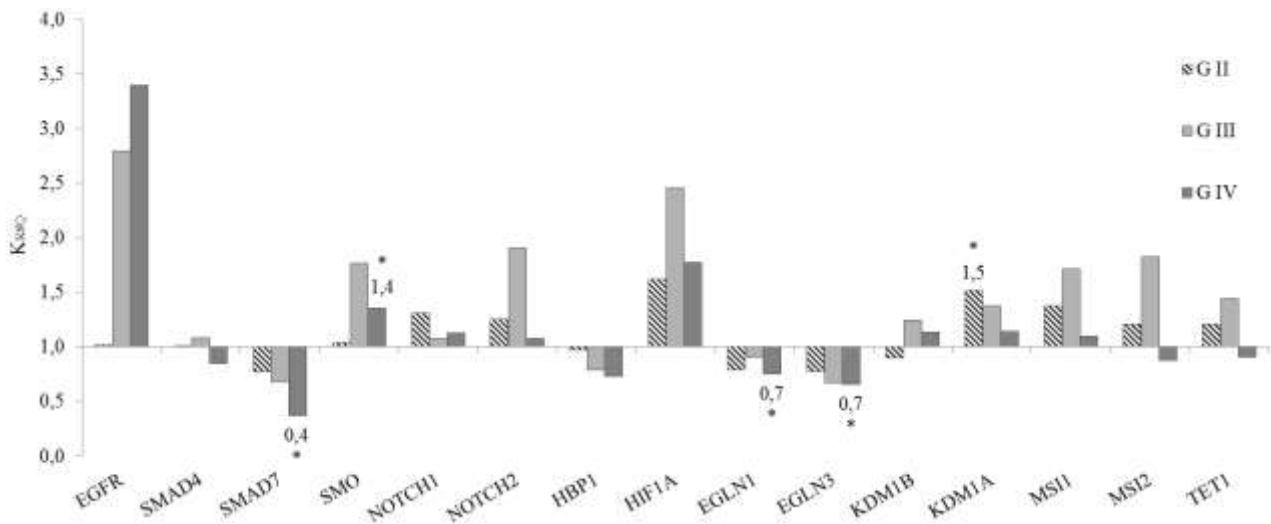


Рис. 1. Изменение относительной экспрессии исследуемых генов в образцах глиом с разной степенью злокачественности

* - $p < 0,05$. $K_{RSQ} = RSQ_{опухоль} / RSQ_{норма}$.

С увеличением степени злокачественности глиом наблюдается увеличение относительной экспрессии гена *EGFR*, в группе G IV транскрипционная активность *EGFR*, выявленная для опухоли, превышает в 2,2 раза показатель условной нормы ($p=0,093$).

Отметим, что aberrantный паттерн экспрессии, очевидно, характерен преимущественно для глиобластом, хотя и не позволяет дискриминировать группу G IV от более дифференцированных глиом.

Изменение экспрессии 15 локусов в опухолях с мутантным статусом гена *IDH1* (Mut *IDH*) и с «диким типом» *IDH1* (WT *IDH*) проиллюстрировано на рисунке 2.

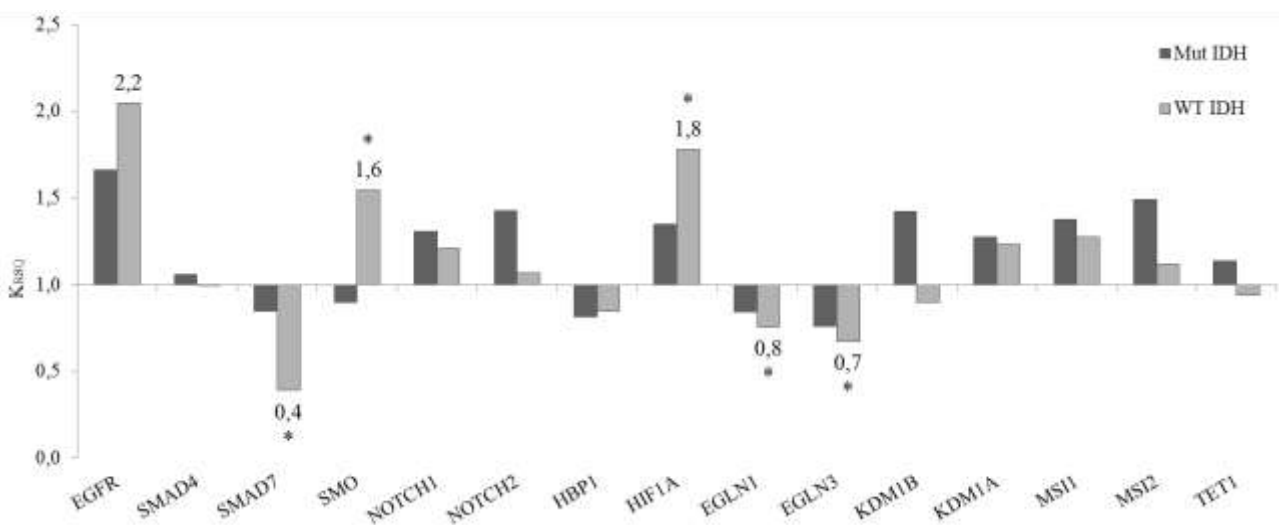


Рис. 2. Уровень относительной генной экспрессии 15 локусов в опухолях с разным статусом гена *IDH*

* - $p < 0,05$. $K_{RSQ} = RSQ_{опухоль} / RSQ_{норма}$.

Статистически достоверных отличий относительной генной экспрессии в группе опухолей с мутантным статусом гена *IDH* (Mut IDH) не выявлено. В группе с WT IDH статусом выявлены статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение транскрипционной активности трех генов *SMAD7*, *EGLN1* и *EGLN3* соответственно в 2,5 раза (52% случаев), в 1,25 (34% случаев) и в 1,4 (42% случаев) (рис. 2). И напротив, повышение уровня RCQ ($p < 0,05$) отмечено для генов *HIF1A* и *SMO* соответственно в 1,8 раза (у 64% пациентов) и в 1,6 (у 52% пациентов). В этой же группе у 57% пациентов наблюдается тенденция ($p = 0,07$) к увеличению экспрессии гена *EGFR* в 2,2 раза. Сравнительный анализ показал достоверную дифференциацию групп с разным статусом гена *IDH* по относительной экспрессии гена *SMAD7* ($p = 0,012$).

Несмотря на высокую степень варьирования показателя относительной экспрессии, продемонстрированная прямая корреляция транскрипционной активности гена *EGFR* с увеличением степени злокачественности (рис. 1) предполагает успешность таргетной терапии данной молекулярной мишени. Особенно это актуально для группы глиом IDH-WT с более агрессивным течением заболевания и меньшей выживаемостью в отличие от глиом с IDH Mut [7]. Например, в исследовании ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02331693, использовали анти-EGFR CAR T-клетки в лечении пациентов с глиомой, сверхэкспрессирующих EGFR, по данным вестерн-блоттинга FISH или ОТ-ПЦР (результаты не опубликованы). Отметим, что в этом исследовании нет критерия включения по поводу наличия мутации в генах IDH.

Снижение экспрессии гена *SMAD7* опосредует активацию TGF- β сигнального каскада, что приводит к пролиферации опухолевых клеток, так как нормальная активность *SMAD7* заключается в рекрутировании *TGFBR1*. TGF- β сигнальный каскад в опухолевых клетках оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию [8]. Изменение профиля экспрессии *SMAD7* требует более пристального изучения сигнального пути TGF- β .

Общей характеристикой для всех групп сравнения было снижение экспрессии генов *EGLN1* и *EGLN3*. Возможный биологический эффект снижения активности пролигидроксилаз, кодируемых этими генами, может реализовываться в конститутивной активации HIF1A. Таким образом, истощение пула альфа-кетоглутарата, который необходим для активности EGLN1 и EGLN3, не является единственной причиной активации HIF1A-сигнального пути [9].

В нашей работе продемонстрирована обратная зависимость степени злокачественности глиомы и экспрессии гена *KDM1A* (рис. 2), кодирующего лизин-

специфичную гистоновую деметилазу. Кроме того, в исследованной группе пациентов выявлена широкая представленность aberrантной экспрессии *KDM1A* (33%), что особо актуально в связи с разработкой препаратов, регулирующих экспрессию гена *KDM1A*, уже реализованных в клинические испытания для терапии глиом ранних стадий [10].

Заключение. Выявленное в глиальных опухолях по сравнению с условно нормальной тканью изменение экспрессии генов-участников сразу нескольких сигнальных путей (EGFR, TGF- β , SMO) подчеркивает гетерогенность молекулярных процессов, стимулирующих развитие глиом головного мозга. Достоверные различия экспрессии исследуемых локусов в опухоли были характерны преимущественно для глиобластом G IV. Полученные данные позволили выделить группу молекулярных маркеров (*SMAD7*, *SMO*, *EGLN1/3*, *HIF1A*, *KDM1A*), с высокой частотой изменяющих транскрипционную активность в глиальных опухолях и перспективных для использования в таргетной терапии и дифференциальной диагностике.

Список литературы

1. Кит О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е., Франциянц Е.М., Панина С.Б. Молекулярно-генетические маркеры глиом // Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология. 2017. № 4. С. 132-140.
2. Chin L. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 2008. no. 455. P. 1061-1068.
3. Vandesompele J., Preter K.D., Pattyn F., Poppe B., Roy N.V., Paere A.D., Spelema F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology. 2002. no. 7. P. 34.
4. Кит О.И., Водолажский Д.И., Франциянц Е.М., Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Тимошкина Н.Н., Гудуева Е.Н., Швырев Д.А., Двадненко К.В. Способ прогнозирования развития острой почечной недостаточности по уровню экспрессии генов *CASP3*, *CASP8* И *CASP9* после кратковременной ишемии почки. Патент на изобретение RUS2599099. 17.08.2015
5. Sareddy G.R., Viswanadhapalli S., Surapaneni P., Suzuki T., Brenner A., Vadlamudi R.K. Novel *KDM1A* inhibitors induce differentiation and apoptosis of glioma stem cells via unfolded protein response pathway. Oncogene. 2017. no. 17. P. 23-24.
6. Arensdorf A.M., Marada S., Ogden S.K. Smoothened regulation: a tale of two signals. Trends in pharmacological sciences. 2016. no. 1. P. 62-72.

7. Bale T.A., Jordan J.T., Rapalino O., Ramamurthy N., Jessop N., DeWitt J. C., Nardi V., Alvarez M.M., Frosch M., Batchelor T.T., Louis D.N., Iafrate A.J., Cahill D.P., Lennerz J.K. Financially effective test algorithm to identify an aggressive, EGFR-amplified variant of IDH-wildtype, lower-grade diffuse glioma. *Neuro-oncology*. 2018. no. 201. P. 37.
8. Kavsak P., Rasmussen R.K., Causing C.G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G.H., Wrana J.L. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Molecular cell*. 2000. no. 6. P. 65-75.
9. Semukunzi H., Roy D., Li H., Khan G.J., Lyu X., Yuan S., Lin S. IDH mutations associated impact on related cancer epidemiology and subsequent effect toward HIF-1 α . *Biomed Pharmacother*. 2017. no. 89. P. 805-811.
10. Sareddy G.R., Nair B.C, Krishnan S.C., Gonugunta V.K., Zhang Q., Suzuki T., Miyata N., Brenner A.J., Brann D.W., Vadlamudi R.K. KDM1 is a novel therapeutic target for the treatment of gliomas. *Oncotarget*. 2013. no. 1. P. 18-28.