

УДК 577.218

КОПИЙНОСТЬ ГЕНОВ GSTP1, NFKB1 И ЛОКУСА HV2 МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ НЕКОТОРЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ТИПАХ РАКА ЖЕЛУДКА

Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Малейко М.Л., Двадненко К.В.,
Енин Я.С., Гудуева Е.Н., Ильченко С.А.

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

Изменение копиинности генов является одним из основных механизмов контроля экспрессии ключевых для малигнизации генов, поэтому точная идентификация и характеристика числа копий генов важна для понимания генетических основ биологии опухолей человека и создания предиктивных маркеров малигнизации. Клиническим материалом для исследования послужили ткани (опухолевые и условно здоровые) 29 пациентов Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом рак желудка: аденокарциномой G1-G2, G3, перстневидноклеточным и смешанным раком. Определение относительной копиинности 3 генетических локусов (GSTP1, NFKB1, HV2) проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). В ходе нашего исследования обнаружено, что изменение копиинности исследуемого паттерна генов статистически взаимосвязано, и GSTP1 может быть использован в качестве биомаркера перстневидноклеточного рака и присутствия перстневидноклеточного компонента в аденокарциноме желудка.

Ключевые слова: копиинность генов, аденокарцинома, перстневидноклеточный рак, Real-Time qPCR, факторы транскрипции, гипервариабельный участок 2 митохондриальной ДНК

THE COPY NUMBER OF GENES GSTP1, NFKB1 AND HYPERVARIABLE REGION 2 OF MITOCHONDRIAL DNA IN SOME HISTOLOGICAL TYPES OF GASTRIC CANCER

Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Maleyko M.L., Dvadenko K.V., Enin Y.S.,
Gudueva E.N., Ilchenko S.A.

Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Rostov-on-Don, e-mail: ilchenkosergei@mail.ru

Changes in the number of copies of genes are one of the basic mechanisms controlling the expression of key genes for the processes of malignancy. Accurate identification and characterization of the relative copy number of genes is important for understanding the genetic basis of the biology of human tumors and the creation of predictive markers of malignancy. Clinical material for the study were tissues (tumor and relatively healthy), of 29 patients of South Russia with histologically confirmed diagnosis of stomach cancer: adenocarcinoma G1-G2, G3, and mixed signet-ring cell of stomach cancer. Determination of the relative copy number of 19 genetic loci (GSTP1, NFKB1, HV2) was performed by Real-Time qPCR (RT-qPCR). Our study detected that the change in gene copy number of the investigated pattern are statistically correlated, and GSTP1 can be used as a biomarker of signet ring cell carcinoma and the presence of signet ring cell component in adenocarcinoma of the stomach.

Keywords: copy number of genes, adenocarcinoma, signet ring cell carcinoma, Real-Time qPCR, transcription factors, hypervariable region 2 of mitochondrial DNA

К настоящему времени рак желудка занимает пятое место среди онкологической заболеваемости и ежегодно поражает около 1 миллиона человек [4]. Кроме того, характеризуется плохим прогнозом: 5 летняя выживаемость обычно не превышает 20%. Безусловно, своевременность выявления данного заболевания играет существенную роль в формировании прогноза.

Трансформация клеток в раковые и опухолевая прогрессия связаны с накоплением изменений в геноме, возникающих в результате нарушения его нормального функционирования под действием наследуемых и приобретенных мутаций. При разных гистологических типах рака желудка показан целый ряд

нарушений генов, которые могут считаться потенциальными молекулярными маркерами, тем более, что некоторые нарушения этих генов могут выявляться уже на ранних стадиях желудочного онкогенеза [1].

GSTP1 кодирует глутатион-S-трансферазу пи, один из ферментов второй фазы системы детоксикации гидрофобных и электрофильных ксенобиотиков и канцерогенов, который осуществляет их превращение из активных метаболитов в нетоксичные водорастворимые компоненты и предотвращает, таким образом, повреждение ДНК [3]. Клиническая роль изменений GSTP1 при раке до сих пор неясна, в литературе имеются данные о снижении его экспрессии при пло-

скоклеточном раке полости рта и данные об увеличении количества копий этого гена в клеточных линиях рака головы и шеи [5].

NFKB1 кодирует транскрипционный фактор NF-κB1 (ядерный фактор «каппа-би») – универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Транскрипционный фактор NF-κB1 может активироваться активными формами кислорода и УФ излучением. В норме активность сигнального пути NF-κB в клетке находится под строгим контролем, однако мутации различных генов могут стать причиной его конститутивной активации. Это имеет место при лимфомах разного происхождения, множественной миеломе и раке [8].

HV2 – локус D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК) относится к регуляторным не кодирующим элементам и обладает высокой мутабельностью. Мутации в этой области наблюдаются при различных онкологических заболеваниях. Делеции в определенных участках мтДНК наблюдаются при раке почки [7].

Изменение числа копий гена является одним из основных механизмов контроля раковой клеткой ключевых для выживания и малигнизации экспрессии генов. Копийность генов или вариация числа копий генов (copy number variation, CNV) – вид генетического полиморфизма, результатом которого может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена, и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена – белка или не кодирующей РНК [6].

Идентификация генов, которые изменяют копийность, очень важна, потому что эти гены могут представлять инициаторную точку генетических изменений.

Цель исследования. Изучить изменения относительной копийности генов GSTP1, NFKB1 и HV2 при разных гистологических типах рака желудка.

Материалы и методы исследования

Изучены образцы тканей (опухолевые и условно здоровые), которые были получены в процессе

хирургического вмешательства в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте с 2013 по 2014 гг., у 29 пациентов с различным гистологическим типом рака желудка: аденокарцинома G1-G2 (15 пациентов), G3 (5 пациентов), перстневидноклеточный рак (5 пациентов) и смешанного типа (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный рак) (4 пациента). 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 классифицировали на две группы: опухолевые (малигнизированные) и контрольные (немалигнизированные) образцы.

Геномную ДНК экстрагировали из свежзамороженных операционных биоптатов тканей желудка с использованием лизирующего SDS-содержащего буфера в присутствии протеиназы-K 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) Assay Kit (Invitrogen, США). для проведения Real-Time qPCR концентрацию образцов ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл.

Определение относительной копийности генетических локусов методом Real-Time qPCR, заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референтного гена в опытной и контрольной пробах [10]. Вывод об изменении дозы гена делается на основании соотношения сигналов, продуцируемых амплификатами изучаемой и референтной последовательностей. Прямые и обратные праймеры были разработаны с использованием референтных последовательностей ДНК NCBI GenBank (таблица). Каждые 25 мкл ПЦР-смеси содержали 10 нг геномной ДНК, 0.2mM dNTP's, по 100 нM прямого и обратного праймеров для референтного гена (RNaseP) или гена-мишени, 2.5 mM MgCl₂, ПЦР-буфер, 0.05u/μl ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* («Синтол», Россия), краситель SYBR®Green I (Invitrogen, США). Амплификация каждой пробы осуществлялась в трех повторениях.

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 красителя FAM для красителя SYBR-Green) и 72°C 15 секунд. Первичные данные RT-qPCR получали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1). Генетический локус B2M 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	GSTP1	NM_000852.3	11q13
4	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 копиюность генетического локуса (RQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct}$. Далее вычисляли медиану $RQ_{\text{оп}}$ опухолевых образцов и медиану $RQ_{\text{к}}$ контрольных для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копиюности генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани: $RQ_{\text{оп}} / RQ_{\text{к}}$.

Результаты исследования и их обсуждение

Хотя гистологическая классификация рака желудка в определённой степени условна, особенно с учётом частой встречаемости смешанных форм рака, она, безусловно, отражает многообразие молекулярного патогенеза данного заболевания. Полученные нами данные также свидетельствуют о том, что изменение относительной копиюности гена *GSTP1* в опухолях разных гистологических типов желудка происходит неодинаково (рисунок).

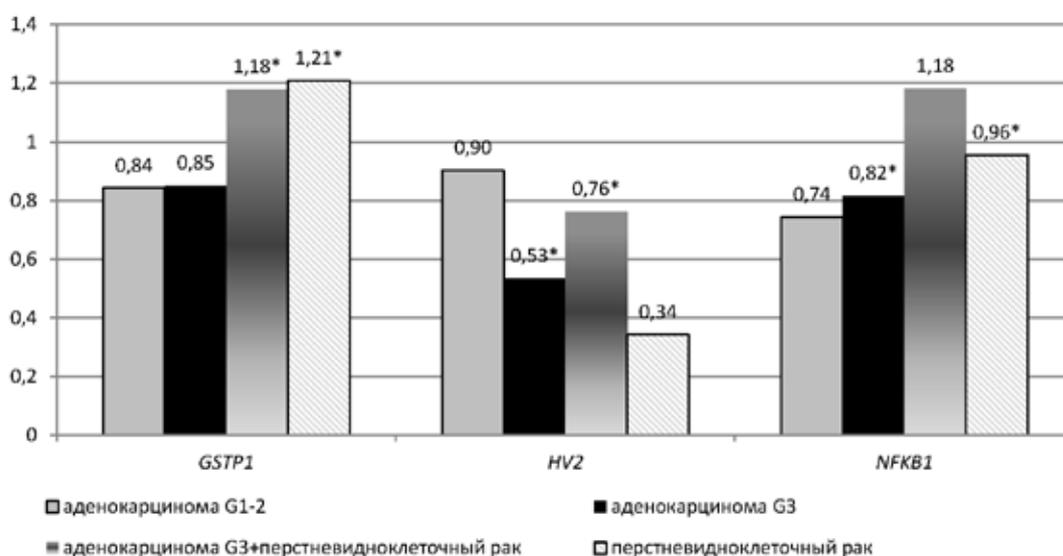
При аденокарциномах желудка разной стадии дифференцировки (G1-3) относительная копиюность гена *Gstp1* достоверно не изменяется по сравнению с условно здоровой тканью. Однако имеется незначительная тенденция к снижению копиюности на 15 и 16% соответственно в опухолевых тканях пациентов с аденокарциномой G3 и аденокарциномой G1-2 по сравнению с условно здоровой тканью. Таким образом, у пациентов с аденокарциномой G3 и аде-

нокарциномой G1-2 копиюность *Gstp1* находится на одном уровне.

У пациентов с перстневидноклеточным и смешанным раком (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный рак) обнаружено достоверное увеличение относительной копиюности *Gstp1* на 21% и 18% ($p < 0,01$) соответственно. Можно предложить, что такое изменение копиюности данного гена присуще исключительно перстневидноклеточному раку желудка, и потому может служить биомаркером перстневидноклеточного рака или присутствия перстневидноклеточного компонента в аденокарциноме.

В ходе нашего исследования обнаружено достоверное снижение копиюности гена транскрипционного фактора *NFKB1* у пациентов с аденокарциномой G3 и перстневидноклеточным раком желудка на 18% и 4% соответственно ($p < 0,05$). При этом наблюдается тенденция к повышению копиюности этого гена у пациентов со смешанным типом рака на 18% и тенденция к снижению копиюности на 26% у пациентов с аденокарциномой желудка G1-2.

Корреляционный анализ изменения относительной копиюности генов *GSTP1* и *NFKB1* у пациентов с разными гистологическими типами рака желудка показал наличие положительной корреляционной связи между этими изменениями ($r = 0,837$), таким образом, характер изменения копиюности этих генов имеет схожие направленность и модальность при рассмотренных гистологических типах рака желудка, за исключением перстневидноклеточного рака.



Изменение копиюности гена *GSTP1*, *NFKB1* и *HV2* при разных гистологических типах рака (* – достоверные отличия, $p < 0,05$)

NF-κB белки играют центральную роль в клеточном ответе на повреждение ДНК. Было показано, что P50/NF-κB1 необходим для цитотоксичности в ответ на повреждение ДНК. Анализ злокачественных опухолей человека, показал, что экспрессия мРНК NFκB1 подавляется в гематологических опухолях по сравнению с контрольными образцами. Эти данные свидетельствуют о том, что NFκB1 является специфическим супрессором опухолей и предотвращает развитие гематологических злокачественных опухолей в условиях алкилирующего повреждения ДНК [9]. Согласно данным литературы, GSTP1 может иметь решающее значение в регуляции активации нескольких каскадов стресс-киназ, включая и ИКК-NFκB сигнальный путь [9]. Вероятно, этим можно объяснить обнаруженную нами связь между изменениями относительной копийности генов GSTP1 и NFκB1.

Также нами показано достоверное снижение относительной копийности гипервариабельного участка 2 (HV2) митохондриальной ДНК у пациентов с аденокарциномой желудка стадии G3 и у пациентов со смешанным типом рака (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный рак) на 47% и 24% соответственно (p<0.05). У пациентов с аденокарциномой G1-2 и с перстневидноклеточным раком наблюдалась лишь тенденция к снижению копийности HV2 на 10% и 66% соответственно. Корреляционный анализ изменений относительной копийности HV2 и гена GSTP1 у пациентов с разными гистологическими типами рака желудка показал наличие слабой отрицательной корреляционной связи между этими изменениями (r=-0,437), таким образом, характер изменения копийности этих генетических локусов носит разнонаправленный характер.

Обнаруженное снижение относительной копийности HV2 у пациентов с аденокарциномой стадии G3 и у пациентов со смешанным типом рака находит подтверждение в данных литературы [7]. Изучение мутаций в контрольной области мтДНК в опухолях желудка показало, что 48% опухолей имеют опухолеспецифические мутации мтДНК [7]. Эти изменения митохондриальных генов, характерные для раковых клеток, инактивируют энергетический метаболизм митохондрий (окислительное фосфорилирование), и изменяют состояние биоэнергетики, переводя клетки в режим преимущественного использования гликолиза (анаэробный режим) для энергетических

и анаболических целей, что объясняет так называемый эффект Варбурга [7]. 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 (локус HV2). Наиболее выражены процессы уменьшения относительной копийности мтДНК (угнетения окислительного фосфорилирования) в тканях опухолей с аденокарциномой G3 и перстневидноклеточным раком желудка.

Выводы

Таким образом, анализ наших данных показал возможность использования гена GSTP1 в качестве биомаркера перстневидноклеточного рака или присутствия перстневидноклеточного компонента в аденокарциноме желудка, а также наличие корреляционных связей в изменениях относительной копийности генов GSTP1, NFκB1 и гипервариабельного участка 2 (HV2) митохондриальной ДНК.

Список литературы

1. Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н. Молекулярно-генетические маркеры рака предстательной железы // Вестник Южного ЦП РАН. – 2009. – Т.5, № 1. – С. 36-52.
2. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел / Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П. и др. – Ростов-н/Д: ООО «Ростиздат», 2001.
3. Рачковский М.И., Гончарова И.А., Белобородова Э.И. и др. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов GSTP1 и GSTM1 с выживаемостью больных циррозом печени вирусной и алкогольной этиологии // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 2. – С. 45-50.
4. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. F.GLOBOCAN 2012 v1.0 // Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013). [Internet]. – Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 16/01/2014.
5. Ma H.L., Yu C., Liu Y. et al. Decreased expression of glutathione S-transferase pi correlates with poorly differentiated grade in patients with oral squamous cell carcinoma // Journal of Oral Pathology & Medicine. – 2015. – Vol. 44, Is. 3, P. 193–200.
6. Nadauld L. et al. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors // PCR. Transl. Med. 2012. P. 1-5.
7. Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – Vol. 942, P. 287-308.
8. Staudt L.M. Oncogenic activation of NF-kappaB // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2010. – В. 6. – Т. 2. – С. a000109. – DOI:10.1101/cshperspect.a000109 – PMID 20516126.
9. Voce D.J., Schmitt A.M., Uppal A. et al. Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor // Oncogene. – 2014. – doi:10.1038/onc.2014.211.
10. Wisnieski F., Calcagno D.Q., Leal M.F. et al. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines // World J. Gastroenterol. – 2013. – Vol. 19, (41). P. 7121-7128.