

УДК 577.218

## ОТНОСИТЕЛЬНАЯ КОПИЙНОСТЬ АПОПТОЗ-РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕНОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ 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 Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: [ilchenkosergei@mail.ru](mailto:ilchenkosergei@mail.ru)

Процесс онкотрансформации клеток тесно связан с изменениями в апоптотических сигнальных путях, поэтому исследование изменений относительной копиюности генетических локусов, ответственных за апоптоз, при малигнизации тканей желудка является важным для обнаружения инициаторных точек генетических изменений и разработки высокоспецифичных онкомаркеров. Определение относительной копиюности 8 генетических локусов (BAX, CASP3, CASP8, BCL2, CASP8/FADD, P53, CASP9, MDM2) в тканях пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом рак желудка проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). Установлено достоверное снижение копиюности генов BAX, CASP3, CASP8, CASP9, P53 и увеличение копиюности BCL2 в опухолевых тканях пациентов с раком желудка, причем характер данных изменений специфичен для каждого гистологического типа рака.

**Ключевые слова:** относительная копиюность генов, рак желудка, Real-Time qPCR

## COPY NUMBER VARIATIONS OF APOPTOSIS-REGULATING GENE AS INDICATOR OF STOMACH TISSUE MALIGNANCY

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

Federal State Institution «Rostov Research Institute of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: [ilchenkosergei@mail.ru](mailto:ilchenkosergei@mail.ru)

Process oncotransformation cells closely associated with changes in apoptotic signaling pathways, so the study of changes of relative copy number of genetic loci responsible for apoptosis, with malignancy stomach tissue is important for the detection of initiating points of genetic changes and the development of highly specific tumor markers. Definition of the relative copy number of 8 genetic loci (BAX, CASP3, CASP8, BCL2, CASP8 / FADD, P53, CASP9, MDM2) in the tissues of patients with histologically confirmed diagnosis of gastric cancer was carried out by Real-Time qPCR (RT-qPCR). Established a significant decrease copy number of genes BAX, CASP3, CASP8, CASP9, P53 and increase copy number of BCL2 in tumor tissues of patients with gastric cancer, and the nature of these changes are specific to each histological type of cancer.

**Keywords:** relative copy number of genes, gastric cancer, Real-Time qPCR

В настоящее время в мире рак желудка является четвертой по частоте заболеваемости у мужского населения и пятой – среди женского, и второе место в структуре общей летальности от злокачественных новообразований. Среди 45 стран мира Россия занимает 1-е место по уровню смертности от данного заболевания [5].

Трансформация нормальных клеток в раковые связана с накоплением изменений в геноме под действием наследуемых и приобретенных мутаций [10]. Трансформированные клетки получают возможность выживать в организме за счет изменений в апоптотических сигнальных путях, что обеспечивает приобретение неограниченного потенциала к пролиферации и способности к инвазии и метастазированию. Молекулярные изменения, ответственные за приобретение вышеуказанных свойств, могут использоваться в качестве онкомаркеров [1].

Процесс апоптоза можно разделить на три фазы: сигнальную, эффекторную и де-

градационную. Несмотря на разнообразие иницирующих факторов, выделяются два основных пути передачи сигнала апоптоза: рецептор-зависимый и митохондриальный. Рецептор-зависимый сигнальный путь реализуется через взаимодействие рецептора Fas с адаптером FADD, который взаимодействует с прокаспазой 8. Митохондриальный сигнальный путь реализуется в результате выхода апоптотических белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки вследствие повышения проницаемости наружной мембраны митохондрий, существенную роль в этом играет апоптотический белок Вах. В течение эффекторной фазы происходит активация каспазного каскада. Инициаторные каспазы (– 2, – 8, – 9, – 10, – 12) активируют эффекторные (– 3, – 6, – 7) каспазы, которые в свою очередь непосредственно участвуют в трансформации клетки. В итоге морфологические и биохимические изменения приводят к гибели клетки [3, 4]. Важную роль

играет белок p53, который принимает участие в запуске апоптоза путём стимуляции рецепторов смерти, путём взаимодействия с промотором апоптоза – Bax, путём активации p53-зависимого модулятора PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), который блокирует действие Bcl-2 [9].

Изменение относительного 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 относительного числа копий определенного гена, и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена – белка или не кодирующей РНК [8].

Изучена амплификация гена *MDM2* при раке желудка, и показано, что увеличение копийности этого гена коррелирует с увеличенной экспрессией белка MDM2 и снижением экспрессии белка P53. Ген *MDM2* считается негативным регулятором функции белка P53. MDM2/P53 путь является важной составной частью канцерогенеза. Только около 20 % случаев рака желудка не связаны с изменением копийности генов *MDM2* и *P53* [7].

Идентификация генов, которые как сверхэкспрессируются и амплифицируются, так и снижают экспрессию и делетируются очень важна, потому что эти гены могут представлять инициаторную точку генетических изменений.

### Цель исследования

Изучить механизмы малигнизации тканей желудка на примере изменения относительной копийности генетических локусов, ответственных за апоптоз.

### 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 (не малигнизированные) образцы.

В дальнейшем геномную ДНК экстрагировали из свежезамороженных биоптатов 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.

Метод определения относительной копийности генетических локусов методом Real-Time qPCR, заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референтного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении дозы гена делается на основании соотношения сигналов, продуцируемых амплификатами изучаемой и референсной 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, 0,2 mM dNTP's, по 100 нМ прямого и обратного праймеров для референтного гена (RNaseP) или гена-мишени, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, ПЦР-буфер, 0,05 u/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.

Усредненные данные по каждому генетическому локусу нормировались по усредненному показателю референтного гена *B2M* для получения величины  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct(\text{исследуемого гена}) - Ct(B2M)$ ). Относительную копийность генетического локуса (RQ) рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta Ct}$ . Далее вычисляли медиану  $RQ_{оп}$  опухолевых образцов и медиану  $RQ_{к}$  контрольных для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копийности генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани:  $RQ_{оп} / RQ_{к}$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

У пациентов с аденокарциномой (G1-2) нами были исследованы 10 генетических локусов, 2 из которых были использованы в качестве референтных (*ACTB* и *B2M*), и была выявлена статистически не достоверная тенденция к амплификации генетических локусов *CASP8* и *MDM2* на 137 и 377% соответственно и тенденция к снижению копийности генов *CASP3* и *P53* на 27 и 23% соответственно (рис. 1). Суще-

ственного и статистически достоверного изменения копийности других генетических локусов регуляции апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *CASP8/FADD*, *CASP3*, *CASP9*, *P53*) в тканях пациентов с аденокарциномой (G1-2) в ходе данного исследования мы не обнаружили.

У пациентов с аденокарциномой желудка (G3) в рамках настоящего исследования обнаружены статистически достоверные снижения копийности 5 генетических локусов в опухолевой ткани желудка по сравнению с нормальной тканью (рис. 2).

Панель праймеров для определения относительной копийности генов

№ п/п	Наименование	№ NCBI GenBank	Хромосомная локализация
1	<i>ACTB</i>	NM_001101.3	7p22
2	<i>B2M</i>	NM_004048.2	15q21-q22.2
3	<i>BAX</i>	NM_138761.3	19q13.3-q13.4
4	<i>CASP3</i>	NM_004346.3	4q34
5	<i>CASP8</i>	NM_001080125.1	2q33-q34
6	<i>BCL2</i>	NM_000633.2	18q21.3
7	<i>CASP8/FADD</i>	NM_003879.5	2q33-q34
8	<i>P53</i>	NM_000546.5	17p13.1
9	<i>CASP9</i>	NM_032996.3	1p36.21
10	<i>MDM2</i>	NM_002392.5	12q13-q14

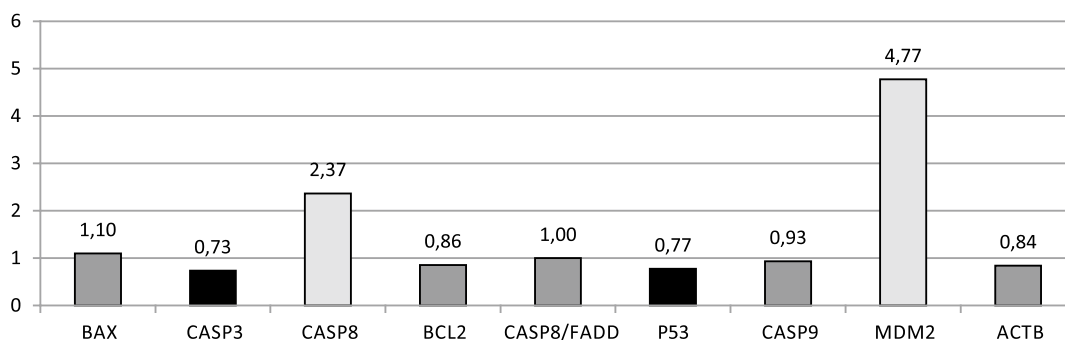


Рис. 1. Соотношение относительной копийности генов в опухолевой и нормальной ткани пациентов с аденокарциномой (G1-2)

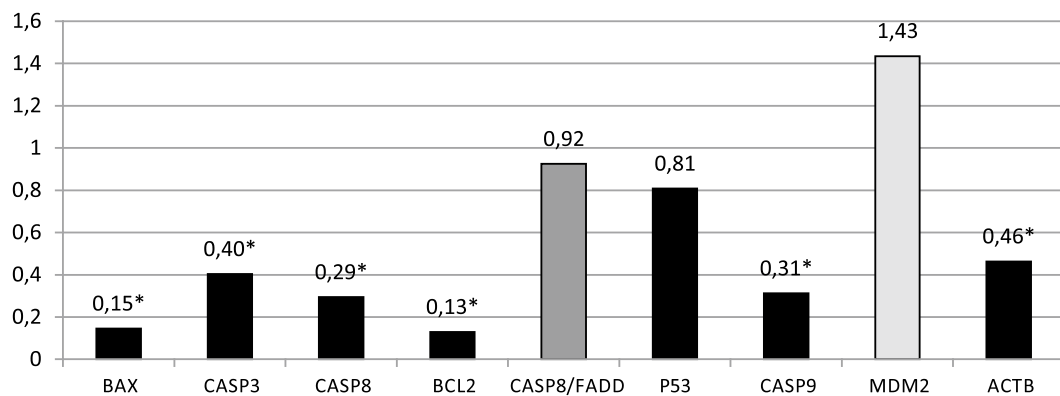


Рис. 2. Соотношение относительной копийности генетических локусов в опухолевой и нормальной ткани пациентов с аденокарциномой (G3) (\* – достоверные отличия,  $p < 0,05$ )

Относительная копияность была статистически достоверно снижена для порогового уровня  $p < 0,05$  для генов: *BAX* на 85,5%, *CASP3* на 59,7%, *CASP8* на 70,6%, *BCL2* на 87,1% и *CASP9* на 68,8%. Также наблюдалось статистически достоверное снижение копияности гена *ACTB* (housekeeping genes), кодирующего белок  $\beta$ -актин, на 53,7%. Относительная копияность генетических локусов *BAX* и *BCL2*, кодирующих белки ответственные за активацию и подавление митохондриального апоптоза, изменялись однонаправленно, снижаясь на 85 и 87% соответственно. Уменьшение относительной копияности затронуло гены, кодирующие как регуляторные (*CASP8* и 9), так и эффекторные каспазы (*CASP3*). Статистически достоверного увеличения относительной копияности генов на данной стадии дифференцировки опухоли не обнаружено, наблюдалась лишь тенденция к амплификации генетического локуса *MDM2* на 43% и к снижению копияности гена *P53* на 19%.

У пациентов со смешанным типом рака (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный рак) обнаружено статистически достоверное для порогового уровня ( $p < 0,05$ ) снижение копияности генов *BAX* на 24%, *CASP8* на 22% и *CASP9* на 19%. При этом обнаружена тенденция к амплификации генов *BCL2* и *CASP8/FADD* на 86% и 73% соответственно и тенденция к снижению копияности гена *MDM2* на 63% (рис. 3).

У пациентов с перстневидноклеточным типом рака желудка обнаружено статистически достоверное снижение относительной копияности гена *P53* на 46% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с условно нормальной тканью (рис. 4).

При этом относительная копияность гена *BCL2* статистически достоверно увеличилась на 90% ( $p < 0,05$ ). Также обнаружена тенденция к амплификации генов *BAX* и *CASP8/FADD* на 68% и 75% соответственно и тенденция к снижению относительной копияности генов *CASP9* и *ACTB* на 44% и 20% соответственно.

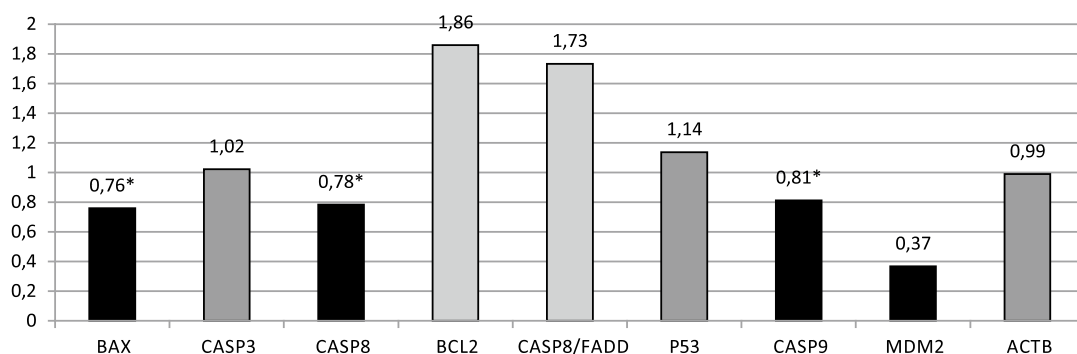


Рис. 3. Соотношение относительной копияности генов в опухолевой и нормальной ткани пациентов со смешанным типом рака (\* – достоверные отличия,  $p < 0,05$ )

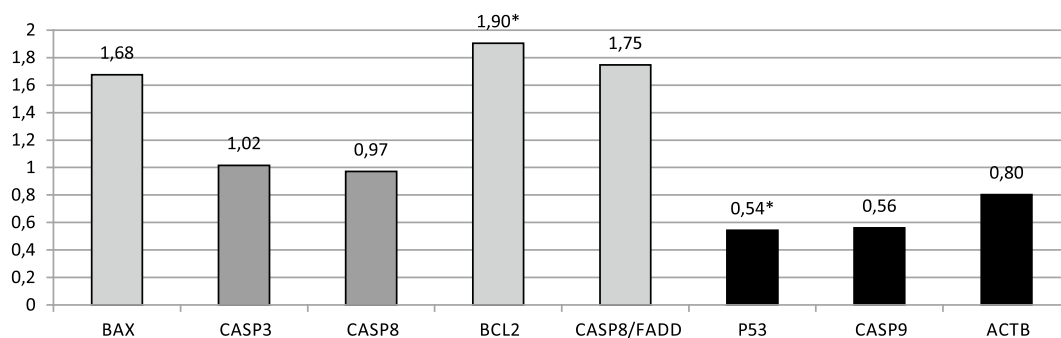


Рис. 4. Соотношение относительной копияности генов в опухолевой и нормальной ткани пациентов с перстневидноклеточным раком (\* – достоверные отличия,  $p < 0,05$ )

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изменение относительной копийности генов в опухолях разных гистологических типов и на разных стадиях дифференцировки опухоли происходит неодинаково.

В нашем исследовании отмечается факт достоверного повышения (на 90%) и выраженной тенденции к повышению (на 86%) относительной копийности гена *BCL2* в опухолевой ткани перстневидноклеточного и смешанного рака (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный) в противоположность со снижением относительной копийности этого же гена, при аденокарциноме G3 (на 87%) и незначительной тенденции к снижению при аденокарциноме G1-2 (на 14%). По данным литературы, биологически и этиологически у разновидностей рака желудка имеются различия и в экспрессии онкогенов и в инактивации генов-онкосупрессоров [9], следовательно, отличия могут наблюдаться и в относительной копийности одних и тех же генов, и в опухолевых тканях желудка разного гистотипа. Корреляционный анализ изменения относительной копийности исследуемого паттерна генов в опухолевых тканях показал наличие положительной корреляционной связи между изменениями, обнаруженными у пациентов с аденокарциномой G3 и аденокарциномой G1-2 ( $r = 0,663$ ), положительной корреляционной связи между изменениями, обнаруженными у пациентов со смешанным типом рака (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный) и перстневидноклеточным раком ( $r = 0,624$ ), и отрицательной корреляционной связи между изменениями, обнаруженными у пациентов аденокарциномой G3 и смешанным типом рака ( $r = 0,608$ ). Этот факт демонстрирует, что изменения относительной копийности в генетических локусах, регулирующих апоптоз, при различных гистотипах рака желудка имеют не только количественный, но и качественно разный характер.

Наблюдаемая при высококодифференцированной аденокарциноме (G1-2) тенденция к увеличению копийности гена *MDM2* на 377% сопровождается тенденцией к снижению копийности *P53* на 23%. Схожая тенденция к амплификации генетического локуса *MDM2* на 43% и к снижению копийности гена *P53* на 19% наблюдается и при переходе к умеренно- и низкодифференцированной аденокарциноме (G3). Направление этих изменений, обнаруженное в ходе исследования было ожидаемым, так

продукт гена *MDM2* является негативным регулятором *P53*, и подобные изменения описаны для рака желудка [7]. Однако достоверное снижение копийности гена *P53* в нашем исследовании наблюдается только в опухолевых тканях желудка у пациентов с перстневидноклеточным раком. А у пациентов со смешанным типом рака копийность гена *P53* не изменяется.

Неодинаково изменяется относительная копийность генов, кодирующих регуляторные (*CASP8* и 9) и эффекторные каспазы (*CASP3*), у пациентов с разным гистологическим типом желудка. Так при аденокарциноме (G1-2) имеется тенденция к снижению копийности *CASP3* на 27%, при аденокарциноме (G3) наблюдается достоверное снижение копийности на 59,7%. А при смешанном и перстневидноклеточном раке копийность этого гена не изменяется. Гены регуляторных каспаз (*CASP8* и 9) достоверно снижают свою копийность только у пациентов с аденокарциномой G3 и смешанным типом рака. У пациентов с перстневидноклеточным раком имеется лишь тенденция к снижению копийности *CASP9*.

Копийность гена *CASP8/FADD* статистически достоверно не изменяется, однако у пациентов со смешанным типом (аденокарцинома G3 + перстневидноклеточный рак) и перстневидноклеточным раком имеется тенденция к увеличению копийности этого гена в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной на 73 и 75% соответственно, что могло бы свидетельствовать о потенциально большей вероятности активации внешнего сигнального пути апоптоза. Интересно, что у пациентов с этими двумя гистологическими типами рака желудка также наблюдается тенденция и достоверное увеличение копийности гена анти-апоптозного белка *BCL2* на 86% и 90% соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли изменения копийности апоптоз-регулирующих генов *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *BCL2*, *P53* и *CASP9* в малигнизации тканей желудка и возможном использовании их относительной копийности в качестве онкомаркеров для разных гистологических типов рака желудка.

#### Список литературы

1. Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н. Молекулярно-генетические маркеры рака предстательной железы // Вестник Южного НЦ РАН. – 2009. – Т. 5, № 1. – С. 36–52.
2. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел / И.В. Корниенко, Д.И. Водолажский, В.П. Вейко и др. – Ростов-н/Д: ООО «Ростиздат», 2001.



3. Льюин Б. и др. Клетки. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 951 с.

4. Сербин М.Е., Щербак Е.В. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сборник / Под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2004. – В. 1.

5. Чиссов В.И. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Старинского В.В., Петрова Г.В. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. – 2013. – 289 с.

6. Dicken B.J. et al. Gastric Adenocarcinoma Review and Considerations for Future Directions // *Ann Surg.* – 2005. – № 241 (1). – P. 27–39.

7. Günther T. et al. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations // *A Mod Pathol.* – 2000. – № 13 (6). – P. 621–626.

8. 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.

9. Vaux D.L. Apoptosis Timeline // *Cell Death and Differentiation.* – 2002. – Vol. 9. – P. 349–354.

10. Zhu C.Q. et al. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach // *J. Clin. Pathol.* 2006. – № 59 (8). – P. 790–800.

### References

1. Vodolazhskij D.I., Timoshkina N.N. Molekularno-geneticheskie markery raka predstatel'noj zhelezy // *Vestnik Juzhnogo NC RAN.* 2009. Т. 5, no. 1. pp. 36–52.

2. Podgotovka biologicheskogo materiala dlja molekuljarno-geneticheskikh identifikacionnyh issledovanij pri massovom postuplenii neopoznannyh tel / I.V. Kornienko, D.I. Vodolazhskij, V.P. Vejko i dr. Rostov-n/D: ООО «Rostizdat», 2001.

3. L'juin B. i dr. Клетки. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 951 p.

4. Serbin M.E., Scherbak E.V. Apoptoz i ego molekuljarnye jeffektory // *Aktual'nye problemy biologii, mediciny i jekologii: Sbornik / Pod red. N.N. Il'inskih.* Tomsk: Sibirskij gosudarstvennyj medicinskij universitet, 2004. V. 1.

5. Chissov V.I. Zlokachestvennye novoobrazovanija v Rossii v 2011 godu (zabolevaemost' i smertnost') / Pod red. Starinskogo V.V., Petrova G.V. М.: FGBU «MNIОI im. P.A. Gercena» Minzdrava Rossii. 2013. 289 p.

6. Dicken B.J. et al. Gastric Adenocarcinoma Review and Considerations for Future Directions // *Ann Surg.* 2005. no. 241 (1). pp. 27–39.

7. Günther T. et al. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations // *A Mod Pathol.* 2000. no. 13 (6). pp. 621–626.

8. Nadauld L. et al. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors // *PCR. Transl. Med.* 2012. pp. 1–5.

9. Vaux D.L. Apoptosis Timeline // *Cell Death and Differentiation.* 2002. Vol. 9. P. 349–354.

10. Zhu C.Q. et al. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach // *J. Clin. Pathol.* 2006. no. 59 (8). pp. 790–800.