

УДК 618.19-018-006-097:575.222.78:575.117.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-250-259

Для цитирования: Цыганов М.М., Дерюшева И.В., Гарбуков Е.Ю., Ибрагимова М.К., Казанцева П.В., Бычков В.А., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. Явление потери гетерозиготности в опухолевой ткани молочной железы: связь с экспрессией генов монорезистентности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 250–259.

Явление потери гетерозиготности в опухолевой ткани молочной железы: связь с экспрессией генов монорезистентности

Цыганов М.М.¹, Дерюшева И.В.¹, Гарбуков Е.Ю.¹, Ибрагимова М.К.^{1,2},
Казанцева П.В.¹, Бычков В.А.¹, Слонимская Е.М.^{1,3}, Литвяков Н.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Широкогеномное исследование связи потери гетерозиготности (loss of heterozygote, LOH) в опухоли молочной железы с экспрессией генов монорезистентности при проведении неоадьювантной химиотерапии (НХТ).

Материал и методы. В исследование включены 68 больных раком молочной железы РМЖ IIА–IIIВ стадий. РНК выделяли из опухолевого материала до и после лечения с помощью набора RNeasy mini kit Plus. Уровень экспрессии исследуемых генов (*RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *BRCA1*) оценивали при помощи RT-qPCR. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия). Для оценки статуса LOH проведен микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix CytoScan™ HD Array.

Результаты. В исследовании потеря гетерозиготности оценена у 13 815 генов. Частота LOH составила 0–63%. Наибольшая частота встречаемости явления потери гетерозиготности характерна для генов хромосом 16, 17 и X-хромосомы. Установлено, что наличие явления LOH в генах монорезистентности (*BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* и *TYMS*) не сопряжено с их уровнем экспрессии в опухоли. Отмечено 54 гена, LOH в которых статистически значимо ассоциирована с уровнем экспрессии исследуемых генов. Среди них следует отметить гены, кодирующие miRNA и «цинковые пальцы», участвующие в регуляции транскрипции многих генов, трансмембранные транспортеры лекарственных препаратов и ионные каналы, гены MAP-киназного сигнального пути и др.

Заключение. Результаты, полученные в данном исследовании, могут более точно определить экспрессионный портрет в опухоли генов монорезистентности, указать на новые кандидатные гены, участвующие в регуляции экспрессии этих генов. Оценка потери гетерозиготности в опухолевой ткани может быть использована в качестве дополнительного критерия для персонализации назначения химиотерапии.

Ключевые слова: потеря гетерозиготности, рак молочной железы, гены монорезистентности, микроматричные исследования.

✉ Цыганов Матвей Михайлович, e-mail: TsyganovMM@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что одним из факторов, определяющим на индивидуальном уровне вариабельность опухоли, в том числе и опухоли молочной железы, является нормальная генетическая изменчивость, обусловленная генным полиморфизмом (single nucleotide polymorphism, SNP). Для SNP в опухолевой ткани характерно так называемое явление аллельного имбаланса (АИ) и его частный случай – потеря гетерозиготности (loss of heterozygote, LOH), при котором происходит потеря (структурная или функциональная) одного из аллелей гетерозиготного генотипа и уменьшение детектируемых частот гетерозиготных генотипов по сравнению с геномной ДНК. Аллельный имбаланс может быть результатом аллельных делеций (потери одной из копий данного локуса), дупликации, амплификации одного из аллелей. В результате чего только один аллельный вариант SNP определяется в опухоли [1].

Впервые явление LOH в опухоли было описано А. Knudson в 1971 г. Согласно данной двухударной модели канцерогенеза предполагалось, что для инактивации генов-супрессоров необходимо два последовательных мутационных события – утрата одного аллеля в результате LOH и соматические мутации либо метилирование в другом аллеле. Утрата аллеля дает возможность проявления фатальных рецессивных мутаций в оставшемся аллеле [2]. Кроме этого, LOH может приводить к активации онкогенов и инактивации опухолевых генов-супрессоров, которые могут в свою очередь приводить к неконтролируемому росту клеток и метастазированию [3, 4].

В настоящее время LOH хорошо изучена и показана для многих генов в различных локализациях опухолевого процесса. Предполагается, что биологический смысл LOH применительно к канцерогенезу связан с инактивацией гетерозиготных локусов патогенетически значимых генов, в результате чего может происходить прогрессирование и (или) метастазирование опухоли [5–7]. Что касается рака молочной железы, то основным направлением исследований является изучение LOH в таких биомаркерах, как *ERBB2* (*HER2*) [8], *BRCA1* и *BRCA2* [9, 10].

В крупной работе на предмет аллельного имбаланса и LOH при РМЖ авторами были исследованы такие гены, как *EGFR*, *TERT*, *TP53*, *CASP8*, *PARP2*, *GATA3*, и *BRCA1* [11]. В 2012 г. в исследовании N.J. Virkбак продемонстрировано, что потеря гетерозиготности в теломерных участках хромосом опухолевых клеток молочной железы

и яичника является хорошим прогностическим маркером для данных злокачественных новообразований [12]. Таким образом, большинство исследований потери гетерозиготности в опухоли молочной железы сосредоточено на изучении данного феномена в рамках одного или нескольких генов, и, как правило, связано с процессом малигнизации [13]. При этом LOH практически не изучалась в широкогеномном формате.

Целью данной работы явилось широкогеномное исследование связи потери гетерозиготности в опухоли молочной железы с экспрессией генов монорезистентности, определяющих чувствительность опухоли к отдельным препаратам. В частности, изучена экспрессия генов *BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* и *TYMS*, которые определяют чувствительность опухоли к препаратам платины (*BRCA1* и *ERCC1*), гемзару (*RRM1*), иринотекану (*TOP1*), доксорубицину (*TOP2a*), таксанаму (*TUBB3*) и капецитабину (*TYMS*) [14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 68 больных РМЖ IIА–IIIВ стадий с морфологически верифицированным диагнозом в возрасте 28–68 лет, в среднем ($53,43 \pm 0,78$) года ($M \pm SE$) (табл. 1). В соответствии с Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast (April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania) [15] все больные получали 2–4 курса неoadъювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубицин, кселода) или монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НХТ проводилась операция, затем больным проводили два курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и (или) гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.). Были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ и после НХТ. Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и сохраняли при температуре –80 °С (после 24-часовой инкубации при 4 °С) для дальнейшего выделения РНК и ДНК.

Выделение РНК. Тотальную РНК выделяли из 68 образцов опухоли до лечения с помощью набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Германия), с добавлением в раствор РНК ингибитора РНК-аз Ribolock (Fermentas, Lithuania).

Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) (125–210 нг/мкл, $A_{260/A280} = 1,85–1,95$; $A_{260/A230} = 1,80–2,00$). RIN составил 6,6–8,0. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Lithuania) со случайными гексануклеотидами.

Т а б л и ц а 1

Клинико-патологические параметры обследованных больных РМЖ		
Клинико-патологический параметр		Число больных, абс. (%)
Возраст (лет)	≤45	21 (30,9)
	>45	47 (69,1)
Менструальный статус	Пременопауза	36 (52,9)
	Постменопауза	32 (47,1)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	58 (85,3)
	Инвазивный дольковый рак	3 (4,4)
	Медулярный рак	2 (2,9)
	Другие типы	5 (7,4)
Размер опухоли	T ₁	9 (13,2)
	T ₂	52 (76,5)
	T ₃	3 (4,4)
	T ₄	4 (5,9)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	27 (39,7)
	N ₁	31 (45,6)
	N ₂	4 (5,9)
	N ₃	6 (8,8)
Рецепторы эстрогена	+	33 (48,5)
	–	31 (42,6)
	Нет данных	4 (5,9)
Рецепторы прогестерона	+	35 (51,5)
	–	29 (42,26)
	Нет данных	4 (5,9)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	47 (69,1)
	++	10 (14,7)
	+++	6 (8,8)
	Нет данных	5 (7,4)
Молекулярный подтип	Люминальный В	40 (59,7)
	Трижды негативный	17 (25,4)
	HER2-позитивный	10 (14,9)
Гистологическая форма	Уницентрическая	45 (66,2)
	Мультицентрическая	23 (33,8)
Схема НХТ	САХ	21 (30,9)
	ФАС	33 (48,5)
	Таксотер	14 (20,6)
Ответ на НХТ	Частичная регрессия	39 (57,4)
	Стабилизация	18 (26,5)
	Прогрессирование	11 (16,2)

Количественная ПЦР. Уровень экспрессии генов монорезистентности: *BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* и *TYMS* оцени-

вали при помощи обратно-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с праймерами и зондами по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия). ПЦР ставилась в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris–HCl, pH 8,8 при 25 °С, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала один цикл – 94 °С, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °С, 10 с и 2-й шаг 20 с – при температуре 60 °С. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) представлены в табл. 1 статьи Е.А. Юмова и соавт. [16]. В качестве гена-рефери использовался ген «домашнего хозяйства» фермента *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase), уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовался по отношению к экспрессии гена-рефери. Относительная экспрессия генов монорезистентности оценивалась с помощью метода Pfaffl [17]. В качестве калибратора использовалась пулированная от 10 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы во время операции у больных, которым не проводилась НХТ.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (50–150 нг/мкл, $A_{260/A280} = 2,10–2,35$; $A_{260/A230} = 2,15–2,40$). Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США), фрагменты ДНК имели массу более 48 kb.

Микроматричный анализ. Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix CytoScan™ HD Array (США), которые содержат 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. неполиморфных маркеров для анализа аберраций числа копий (CNA) и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет также определить участки с потерей гетерозиготности у 13 815 генов. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Для обработки результатов микрочипирования

использовали программу Chromosome Analysis Suite 3.1 (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array.

Поиск участков потери гетерозиготности осу-

ществлялся автоматически с помощью программного обеспечения. В результате идентифицировалось три вида LOH: герминальные (рис. 1, *a*), LOH обусловленные делециями (рис. 1, *b*) и мозаичные участки LOH (рис. 1, *c*).

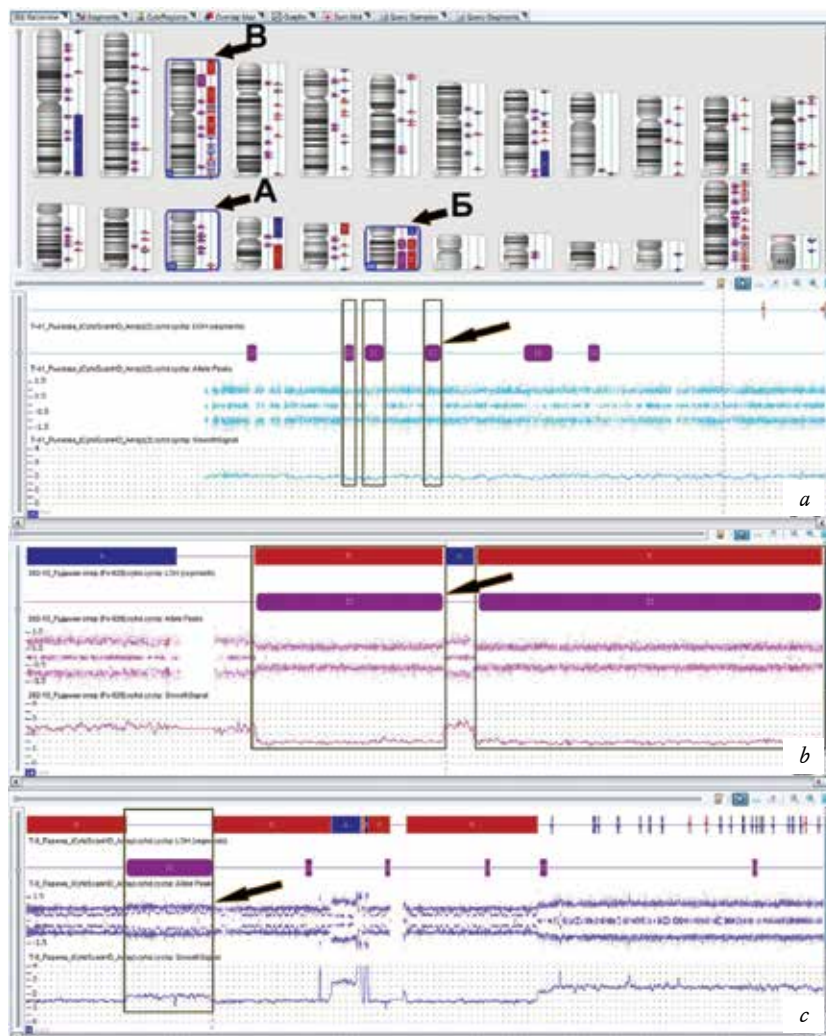


Рис. 1. Участки потери гетерозиготности (показаны стрелками), определяемые программой Chromosome Analysis Suite 3.1: *a* – пример герминальной потери гетерозиготности, фиолетовыми прямоугольниками показаны участки LOH; *b* – пример LOH, обусловленные делециями, красными прямоугольниками обозначены участки делеций и соответствующие им участки потери гетерозиготности; *c* – пример мозаичной LOH

Fig. 1. Areas of heterozygosity loss determined by “Chromosome Analysis Suite 3.1” program (shown by arrows): *a* – is an example of a germinal loss of heterozygosity; purple rectangles show LOH sites; *b* – is an example of LOH caused by deletions, red rectangles denote deletion areas and their corresponding sites of loss of heterozygosity; *c* – is an example of a mosaic LOH

Статистические методы. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона – Манна – Уитни. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Для

анализа общей и безметастатической выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана – Майера [18]. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью log-rank теста. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего на предмет потери гетерозиготности было оценено 13 815 генов. Частота LOH составила 0–63%, (см. рис. 1). Из рис. 2 видно, что наибольшая частота встречаемости явления потери гетерозиготности характерна для хро-

мосом 16, 17 и X-хромосомы. Стоит отметить, что для данных хромосом явление потери гетерозиготности в основном обусловлено наличием делеций. Согласно литературным данным, наибольшая частота делеций в опухоли молочной железы характерна для хромосом 1q, 8p, 8q, 11q, 16q, 17p [19, 20].

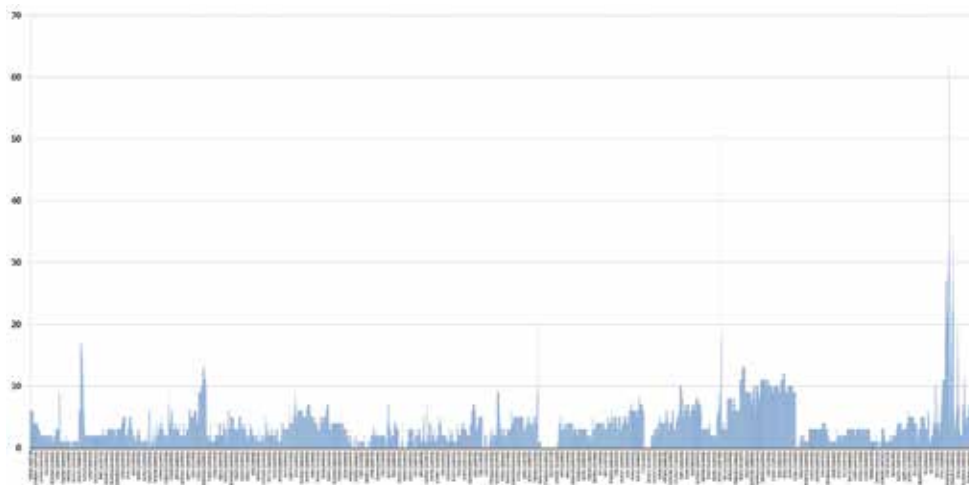


Рис. 2. Частота встречаемости LOH в исследуемых генах по локализации в хромосомах: по оси ординат – частота LOH, %; по оси абсцисс – гены, в которых исследована потеря гетерозиготности

Fig. 2. Frequency of occurrence of LOH in the studied genes by localization in chromosomes: Y – axis shows the LOH frequency, %; X – axis shows the genes in which the heterozygosity loss was investigated

Наибольшая частота LOH (30–60%) наблюдалась в генах *ZNF267*, *PAGE3*, *MAGEH1*, *RRAGB*, *KLF8*, *UBQLN2*, *SPIN2B*, *SPIN2A*, *FAAH2*, *ZXDB*, *ZXDA*, *ARHGEF9*, *FAM123B*, *MSN*, *MIR223*, *VSIG4*, *HEPH*, *EDA2R*, *AR*, *SLC16A2*, *RLIM*, *KIAA2022*, *ABCB7*, *UPRT*, *ZDHHC15*, *MAGEE2*, *MAGEE1*. Поскольку именно потеря одного из аллелей гетерозиготного локуса в таких известных генах-супрессорах, как *TP53*, *RB1*, *BRCA1*, *CDKN1A*, *CDKN1B* и др., сопряжена с повышенным риском развития опухолей различных локализаций [10, 21], то, возможно, имеет смысл проверить значение идентифицированных генов как генов-супрессоров опухолевого

роста. В хромосомах 6, 7, 11 и 14 есть обширные участки, в которых LOH не наблюдалась ни в одном из 68 обследованных случаев. Из 13 815 генов OMIM (PubMed) LOH не встречалась у 873 генов.

В первую очередь оценивалось влияние LOH в самих генах монорезистентности на их начальный уровень экспрессии, а также частоту встречаемости явления потери гетерозиготности (табл. 2). Установлено, что в исследуемых генах монорезистентности частота LOH варьировала 1,5–36,8%. При этом связи с экспрессией не обнаружено, что согласуется с результатами, полученными другими авторами.

Т а б л и ц а 2

Связь начального уровня экспрессии генов монорезистентности с потерей гетерозиготности					
Ген	Экспрессия ($M \pm SE$)		p	Частота, абс. (%)	
	Больные с LOH гена	Нормальное состояние гена		Больные с LOH гена	Нормальное состояние гена
BRCA1	0,803±0,201	0,661±0,091	0,412	13 (19,1)	55 (80,9)
ERCC1	1,058±0,858	0,862±0,13	0,590	3 (4,4)	65 (95,6)
RRM1	0,396±0,085	0,541±0,124	0,704	5 (7,4)	63 (92,6)
TOP1	0,359±0,091	0,575±0,201	0,340	5 (7,4)	63 (92,6)
TOP2A	7,303±1,691	9,928±2,63	0,953	25 (36,8)	43 (63,2)
TUBB3	3,023±0,838	4,463±0,601	0,418	10 (14,7)	58 (85,3)
TYMS	5,835±0,00	1,612±0,185	1,000	1 (1,5)	67 (98,5)

$M \pm SE$ – среднее значение ± ошибка средней

Так, показано, что мутации и LOH в гене *BRCA1* сопряжены с риском развития многих злокачественных новообразований [22], но при этом не коррелируют с экспрессией данного гена [23]. Для другого гена репарации ДНК *ERCC1* также было установлено, что наличие в данном гене метилированного промотора, мутаций, LOH и подобных нарушений может иметь важное значение для развития трипл-негативного рака молочной железы [24]. Еще один интересный результат получен для генов группы топоизомераз. Наличие LOH в *TOP1* сопряжено с низ-

ким начальным уровнем экспрессии гена *TOP2A* ($p = 0,008$), что можно объяснить взаимной корреляцией и взаимодействием двух данных генов (<http://www.genecards.org/>; <http://string-db.org/>).

Далее пациентов разделили на равные группы с экспрессией гена больше или меньше медианы и сравнили частоты встречаемости LOH всех 13 815 генов в данных группах при помощи двухстороннего критерия Фишера. В табл. 3 представлено значение медианы экспрессии для каждого гена до лечения и после НХТ.

Т а б л и ц а 3

Медиана экспрессии генов монорезистентности в опухоли молочной железы до проведения неоадьювантной химиотерапии			
Ген	Название	Локализация	Медиана экспрессии
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer 1	17q21.31	0,55
<i>RRM1</i>	Ribonucleotide Reductase Catalytic Subunit M1	11p15.4	0,33
<i>ERCC1</i>	Excision Repair Cross-Complementation Group 1	19q13.32	0,54
<i>TOP1</i>	Topoisomerase (DNA) I	20q12	0,20
<i>Top2A</i>	Topoisomerase (DNA) II Alpha	17q21.2	3,69
<i>TYMS</i>	Thymidylate Synthetase	18p11.32	1,10
<i>TUBB3</i>	Tubulin Beta 3 Class III	16q24.3	3,36

В результате проведенного анализа установлено 54 гена, наличие потери гетерозиготности в которых статистически связано с начальным уровнем экспрессии исследуемых генов (табл. 4). При этом показано, что наличие LOH в данных генах опухоли молочной железы сопряжено с повышенным и со сниженным уровнем экспрессии генов монорезистентности. По литературным данным только для некоторых генов можно проследить связь с изучаемыми генами монорезистентности. Два гена *SPIN2B* и *SPIN2A* участву-

ют в регуляции клеточного цикла, связанного с ингибированием апоптоза [25], и сопряжены с экспрессией двух генов репарации ДНК *ERCC1* и *BRCA1*. Также транскрипционные факторы из группы генов «цинковые пальцы» (Zinc Finger): *ZXDA*, *ZXDB*, *ZNF469*, *ZFPM1*, участвующих в регуляции транскрипции многих генов [26].

Для гена *SCN4A* в базе данных GeneCards показано, что данный ген кодирует тетродотоксин-резистентный натриевый канал, локализуемый на мембране клетки.

Т а б л и ц а 4

Связь LOH с начальным уровнем экспрессии генов монорезистентности	
Ген	Гены, явление LOH в которых сопряжено с уровнем экспрессии генов монорезистентности
<i>BRCA1</i>	<i>PFKFB1</i> (↑), <i>PAGE3</i> (↑), <i>SPIN2B</i> (↑), <i>SPIN2A</i> (↑), <i>ZXDB</i> (↑), <i>ZXDA</i> (↑) - (<i>Xp11.21</i>)
<i>RRM1</i>	<i>NUP88</i> (↑) - (<i>17p13.2</i>), <i>EFNB1</i> (↑) - (<i>Xq13.1</i>)
<i>ERCC1</i>	<i>P2RY10</i> (↑) - (<i>Xq21.1</i>)
<i>TOP1</i>	<i>PAGE1</i> (↓), <i>PAGE4</i> (↓), <i>CLCN5</i> (↓) - (<i>Xp11.23</i>), <i>DGKK</i> (↓), <i>SHROOM4</i> (↓), <i>BMP15</i> (↓) - (<i>Xp11.22</i>)
<i>TOP2A</i>	<i>FBXO31</i> (↓), <i>MAP1LC3B</i> (↓), <i>JPH3</i> (↓), <i>SLC7A5</i> (↓), <i>CA5A</i> (↓), <i>BANP</i> (↓), <i>ZNF469</i> (↓), <i>ZFPM1</i> (↓), <i>IL17C</i> (↓), <i>CYBA</i> (↓), <i>MVD</i> (↓), <i>SNAI3</i> (↓) - (<i>16q24.2</i>); <i>DCAF7</i> (↓), <i>TACO1</i> (↓), <i>MAP3K3</i> (↓), <i>STRADA</i> (↓), <i>DDX42</i> (↓), <i>PSMC5</i> (↓), <i>SMARCD2</i> (↓), <i>TCAM1P</i> (↓), <i>CSH2</i> (↓), <i>GH2</i> (↓), <i>CSH1</i> (↓), <i>CSHL1</i> (↓), <i>GH1</i> (↓), <i>CD79B</i> (↓), <i>SCN4A</i> (↓), <i>ICAM2</i> (↓), <i>ERN1</i> (↓), <i>PECAM1</i> (↓), <i>POLG2</i> (↓), <i>DDX5</i> (↓) - (<i>17q23.3</i>), <i>SMURF2</i> (↓), <i>GNA13</i> (↓), <i>RGS9</i> (↓), <i>AXIN2</i> (↓) - (<i>17q24.1</i>)
<i>TYMS</i>	<i>HEPH</i> (↓) - (<i>Xq12</i>)
<i>TUBB3</i>	<i>GATA1</i> (↓) - (<i>Xp11.23</i>), <i>EDA2R</i> (↓) - (<i>Xq12</i>)

П р и м е ч а н и е. Для всех представленных генов показана статистическая значимая связь с уровнем экспрессии генов монорезистентности. Уровень значимости находится в пределах $0,05 < p < 0,005$. Жирным шрифтом выделена локализация генов в хромосоме. Рядом с генами стрелками указана сопряженность LOH с повышенным (↑) или сниженным уровнем (↓) экспрессии гена монорезистентности.

В недавней публикации показана роль генов семейства SCN в индуцированной химиотерапии гастро-интестинальной токсичности [27]. Кроме этого, наличие ЛОН в гене *SLC7A5* (solute carrier family) сопряжено с уровнем экспрессии гена *TOP2A*. При этом во многих исследованиях показана важная роль данного гена, в том числе и физиологическая, в транспорте веществ и лекарственных препаратов [28]. Другое исследование продемонстрировало, что наличие нарушений в *SLC7A5* связано с поступлением лекарственных препаратов внутрь клетки, и как следствие они могут влиять на формирование чувствительности и химиорезистентности [29].

Таким образом, была показана связь наличия потери гетерозиготности в 54 генах с уровнем экспрессии генов химиочувствительности у больных РМЖ, и это в дальнейшем может быть использовано как маркер прогноза химиочувствительности опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало наличие явления потери гетерозиготности в опухоли молочной железы. Установлено явление ЛОН для всех исследуемых генов монорезистентности. Но при этом показано отсутствие его влияния на их экспрессию, что можно объяснить низкой частотой встречаемости ЛОН на локусах хромосом, где локализованы данные гены. При помощи микроматричного исследования показано влияние потери гетерозиготности в других генах на экспрессию генов монорезистентности. Всего установлено 54 гена, ЛОН в которых сопряжена с повышенным или сниженным уровнем экспрессии генов монорезистентности. Среди них следует отметить гены, кодирующие miRNA и «цинковые пальцы», участвующие в регуляции транскрипции многих генов, трансмембранные транспортеры лекарственных препаратов и ионные каналы, гены MAP-киназного сигнального пути и т.д.

Поскольку все гены монорезистентности определяют эффективность определенных химиопрепаратов, то результаты, полученные в данном исследовании, могут более точно определить экспрессионный портрет исследуемых генов, указать на новые кандидатные гены, участвующие в регуляции экспрессии генов монорезистентности. Кроме этого, оценка потери гетерозиготности в опухолевой ткани может быть использована в качестве дополнительного критерия для персонализации назначения как неоадьювантной, так и адьювантной химиотерапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают информацию о вкладе. Цыганов М.М. – разработка концепции и дизайна статьи. Дерюшева И.В. – проведение лабораторного исследования. Гарбуков Е.Ю. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Ибрагимов М.К., Бычков В.А. – анализ и интерпретация экспериментальных данных. Казанцева П.В. – анализ и интерпретация клинических данных. Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ № 17-15-01203 «Метастатические клоны опухоли молочной железы».

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Проведенная работа соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. От лиц, участвующих в исследовании, получено информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН (протокол № 1 от 14.01.2013 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer // *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2006; 12: 192–198.
2. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971; 68: 820–823.
3. Chen Y., Chen C. DNA copy number variation and loss of heterozygosity in relation to recurrence of and survival from head and neck squamous cell carcinoma: a review // *Head & Neck*. 2008; 30: 1361–1383.
4. Silva J.M., Silva J., Sanchez A., Garcia J.M., Dominguez G., Provencio M., Sanfrutos L., Jareco E., Colas A., Espaca P. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast can-

- cer patients is a valuable predictor of disease-free survival // *Clinical Cancer Research*. 2002; 8: 3761–3766.
5. Ha G., Roth A., Khattra J., Ho J., Yap D., Prentice L.M., Melnyk N., McPherson A., Bashashati A., Laks E. TITAN: inference of copy number architectures in clonal cell populations from tumor whole-genome sequence data // *Genome Research*. 2014; 24: 1881–1893.
 6. Fleming J.L., Dworkin A.M., Allain D.C., Fernandez S., Wei L., Peters S.B., Iwenofu O.H., Ridd K., Bastian B.C., Toland A.E. Allele-specific imbalance mapping identifies HDAC9 as a candidate gene for cutaneous squamous cell carcinoma // *International Journal of Cancer*. 2014; 134: 244–248.
 7. Shikeeva A., Kekeeva T., Zavalishina L., Andreeva I., Frank G. Allelic imbalance in patients with non-small cell lung cancer // *Архив Патологии*. 2012; 75: 3–8.
 8. Staaf J., Jonsson G., Ringnér M., Baldetorp B., Borg A. Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in HER2-amplified breast cancer // *Breast Cancer Res*. 2011; 13: 129.
 9. Timms K.M., Abkevich V., Hughes E., Neff C., Reid J., Morris B., Kalva S., Potter J., Tran T.V., Chen J. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes // *Breast Cancer Research*. 2014; 16: 475.
 10. Shen J., Medico L., Zhao H. Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression and familial ovarian cancer // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2011; 20: 50–56.
 11. Kotoula V., Zagouri F., Timotheadou E., Alexopoulou Z., Wirtz R., Lyberopoulou A., Lakis S., Gogas H., Charalambous E., Pentheroudakis G. The clinical relevance of genomic characteristics in luminal A and B breast cancer (BC) // *Annals of Oncology*. 2014; 25: iv87–iv87.
 12. Birkbak N.J., Wang Z.C., Kim J.-Y., Eklund A.C., Li Q., Tian R., Bowman-Colin C., Li Y., Greene-Colozzi A., Iglehart J.D. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents // *Cancer Discovery*. 2012; 2: 366–375.
 13. Rosenberg C.L. Allele imbalance or loss of heterozygosity, in normal appearing breast epithelium as a novel biomarker to predict future breast cancer, 2011, DTIC Document.
 14. Цыганов М.М., Родионов Е.О., Миллер С.В., Литвяков Н.В. Обоснование использования экспрессионных маркёров для персонализации химиотерапии рака лёгкого // *Антибиотики и химиотерапия*. 2015; 60: 38–45.
 - Tsyganov M.M., Rodionov E.O., Miller S.V., Litvyakov N.V. Obosnovaniye ispol'zovaniya ekspressionnykh markorov dlya personalizatsii khimioterapii raka logkogo [Substantiation of Expressive Markers Use to Personalize Lung Cancer Chemotherapy] // *Antibiotiki i khimioterapiya – Antibiotics and Chemotherapy*. 2015; 60: 38–45 (in Russian).
 15. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *The Breast Journal*. 2004; 10: 273–294.
 16. Юмов Е.А., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Полищук Т.В., Миллер С.В., Родионов Е.О., Тузиков С.А. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности при немелкоклеточном раке легкого // *Сибирский онкологический журнал*. 2013; 61: 16–22.
 - Yumov E.L., Tsyganov M.M., Litviakov N.V., Polishchuk T.V., Miller S.V., Rodionov E.O., Tuzikov S.A. Ekspressiya genov mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivosti i monorezistentnosti pri nemelkokletochnom rake legkogo [Expression of MDR-genes and monoresistance genes in non-small-cell lung cancer] // *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal – Siberian Journal of Oncology*. 2013; 61: 16–22 (in Russian).
 17. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR // *Nucleic Acids Research*. 2001; 29: e45–e45.
 18. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations // *Journal of the American Statistical Association*. 1958; 53: 457–481.
 19. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E.L. Deletions of multi-drug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy // *Oncotarget*. 2016; 7: 7829–7841.
 20. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // *Breast Cancer Research*. 2010; 12: 42.
 21. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2: a001008.
 22. Alane S., Shah S., Murali R., Rau-Murthy R., Schrader K.A., Offit K. Absence of loss of heterozygosity of BRCA1 in a renal tumor from a BRCA1 germline mutation carrier // *Familial Cancer*. 2013; 12: 125–127.
 23. Roy R., Chun J., Powell S.N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection // *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12: 68–78.
 24. Ribeiro E., Ganzinelli M., Andreis D., Bertoni R., Giardini R., Fox S.B., Broggin M., Bottini A., Zanoni V., Bazzola L. Triple negative breast cancers have a reduced expression of DNA repair genes // *PLoS One*. 2013; 8: e66243.
 25. Fletcher B., Dragstedt C., Notterpek L., Nolan G. Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression // *Leukemia*. 2002; 16: 1507–1518.

26. Gersbach C.A., Gaj T., Barbas C.F. Synthetic zinc finger proteins: the advent of targeted gene regulation and genome modification technologies // *Accounts of Chemical Research*. 2014; 47: 2309–2318.
27. He Y., Winham S., Hoskins J., Glass S., Paul J., Brown R., Motsinger-Reif A., McLeod H. Carboplatin/taxane-induced gastrointestinal toxicity: a pharmacogenomics study on the Scotroc1 trial // *The Pharmacogenomics Journal*. 2015.
28. Liang Y., Li S., Chen L. The physiological role of drug transporters // *Protein & Cell*. 2015; 6: 334–350.
29. Ostertag E.M., Crawford J.S. Genetically Modified Rat Models for Pharmacokinetics, 2010, Google Patents.

Поступила в редакцию 15.03.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Цыганов Матвей Михайлович, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дерюшева Ирина Валерьевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Гарбуков Евгений Юрьевич, канд. мед. наук, врач, ст. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Ибрагимова Марина Константиновна, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Казанцева Полина Вадимовна, мл. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Бычков Вячеслав Алексеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Слонимская Елена Михайловна, д-р мед. наук, врач, профессор, зав. отделением общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН; профессор кафедры онкологии, СибГМУ, г. Томск.

Литвяков Николай Васильевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

✉ Цыганов Матвей Михайлович, e-mail: TsyganovMM@yandex.ru.

УДК 618.19-018-006-097:575.222.78:575.117.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-250–259

For citation: Tsyganov M.M., Deryusheva I.V., Garbukov E.Yu., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Bychkov V.A., Slonimskaya E.M., Litviakov N.V. Phenomenon of loss of heterozygosity in tumour tissue of breast cancer: association with expression of monoresistance genes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 250–259.

Phenomenon of loss of heterozygosity in tumour tissue of breast cancer: association with expression of monoresistance genes

Tsyganov M.M.^{1,2}, Deryusheva I.V., Garbukov E. Yu.¹, Ibragimova M.K.^{1,2}, Kazantseva P.V.¹, Bychkov V.A.¹, Slonimskaya E.M.^{1,3}, Litviakov N.V.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of Russian Academy of Sciences (RAS) 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University (NR TSU) 36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose of work. To perform a genome-wide association study of loss of heterozygosity (LOH) with monoresistance genes expression during neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer.

Materials and methods. The study involved 68 patients with breast cancer. The tumour stages were IIA–IIIB. RNA was extracted from tissue specimens (before and after NAC) using RNeasy Plus mini Kit (Qiagen,

Germany). Expression profiling of the *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *BRCA1* genes was carried out using quantitative real-time PCR (qPCR). DNA was extracted from 68 biopsy specimens of tumour tissues using QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). LOH status was detected using microarray analysis using high density DNA-chip manufactured by Affymetrix CytoScan™ HD Array company.

Results. As a result of the study of loss of heterozygosity was evaluated in 13815 genes. The frequency of LOH varied from 0% to 63%. The highest incidence of heterozygosity loss events is characteristic for genes of 16, 17 and the X-chromosome. Our study established that the phenomenon of loss of heterozygosity in monoresistance genes (*BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* and *TYMS*), is not associated with their level of expression in the tumor. A statistical association has been found between LOH and level of expression of the studied genes in 54 genes. Among them it is necessary to note genes encoding miRNA and «zinc fingers» involved in the regulation of transcription of many genes, transmembrane drug transporters and ion channels, genes of the MAP kinase signaling pathway, and others.

Conclusion. The results of this study allow for the more exact determination of the expression picture of monoresistance genes in the tumor and the indication of new candidate genes which are involved in the regulation of the expression of these genes. Evaluation of the loss of heterozygosity in tumor tissue can be used as an additional criterion for personalizing chemotherapy.

Key words: loss of heterozygosity, breast cancer, monoresistance genes, microarray analysis.

Received March 15.2017
Accepted November 08.2017

Tsyganov Matvey M., PhD, Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Deryusheva Irina V., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Garbukov Evgeniy Yu., PhD, Doctor, Senior Researcher, Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ibragimova Marina K., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Kazantseva Polina V., Junior Researcher, Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Bychkov Viacheslav A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Slonimskaya Elena M., DM, Professor, Head of the Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Litviakov Nikolay V., DBSc, Head of the Laboratory Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Tsyganov Matvey M.**, e-mail: TsyganovMM@yandex.ru.