

УДК 577.218

ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ OCT4 И SOX2 ПРИ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ ЖЕЛУДКА

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

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

Октамер-4 (*OCT4*) и транскрипционный фактор *SOX2* участвуют в регуляции работы человеческих эмбриональных стволовых клеток и поэтому могут играть важную роль в прогрессии развития опухолей. Поскольку мало что известно об эффективности *OCT4* и *SOX2* в качестве потенциальных биомаркеров прогрессии рака желудка, методом RT-qPCR исследовали изменение степени относительной копиюности этих двух генов в различных гистологических типах тканей рака желудка (аденокарцинома G1-2, аденокарцинома G3, аденокарцинома G3 в сочетании с перстневидноклеточным раком и перстневидноклеточный рак) по сравнению с прилежащими здоровыми тканями. Установлено достоверное уменьшение степени относительной копиюности генов *OCT4* и *SOX2* в тканях рака желудка гистологических типов аденокарцинома G1-2 и аденокарцинома G3. При других гистологических типах рака желудка (аденокарцинома G3 в сочетании с перстневидноклеточным раком и перстневидноклеточный рак) достоверного изменения относительной копиюности генов *OCT4* и *SOX2* не обнаружено.

Ключевые слова: относительная копиюность генов, биомаркер, аденокарцинома, перстневидноклеточный рак, Real-Time qPCR, пролиферация, дифференцировка, факторы транскрипции, *OCT4*, *SOX2*

CHANGES IN THE RELATIVE COPY NUMBER OF OCT4 AND SOX2 GENES IN MALIGNANCY OF GASTRIC TISSUE

Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Gevorkyan Y.A., Kutilin D.S., Maleyko M.L.,
Dvadnenko K.V., Enin Y.S., Gudueva E.N.

Federal State Institution «Rostov Research Institute of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian
Federation, Rostov-on-Don, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Octamer-4 (*OCT4*) and the transcription factor *SOX2* are involved in the regulation of human embryonic stem cells and may therefore play an important role in the progression of tumors. Since little is known about the effectiveness of *OCT4* and *SOX2* as potential biomarkers in the progression of gastric cancer, the variation of the degree of the relative copy number of these two genes was investigated by RT-qPCR in different histological types of gastric cancer tissues (adenocarcinoma G1-2, adenocarcinoma G3, adenocarcinoma G3 in combination with signet-ring cell stomach cancer and signet-ring cell cancer solely) compared with the adjacent healthy tissues. The significant decrease in the degree of relative copy number of genes *OCT4* and *SOX2* was found in the tissues of gastric cancer of histological types of adenocarcinoma G1-2 and adenocarcinoma G3. For other histological types of gastric cancer (adenocarcinoma G3 combined with signet-ring cell cancer and signet-ring cell cancer solely) significant changes in the relative copy number of genes *OCT4* and *SOX2* were not detected.

Keywords: relative copy number of genes, adenocarcinoma, signet-ring cell stomach cancer, Real-Time qPCR, proliferation, differentiation, transcription factors, *OCT4*, *SOX2*

По данным ВОЗ, среди злокачественных новообразований у мужского и женского населения рак желудка занимает четвертое и пятое место в мире соответственно [1]. В России рак желудка по распространенности занимает седьмое место среди онкологических заболеваний, но характеризуется более высокой летальностью [2].

Исследования механизмов канцерогенеза необходимы для разработки новых терапевтических подходов и поиска потенциальных молекулярных маркеров, пригодных для ранней диагностики и прогнозирования течения заболевания [3].

Изменение числа копий гена (copy number variation, CNV) является одним из основных механизмов изменения степени экспрессии потенциальных онкогенов

и генов-супрессоров опухолей раковыми клетками [4]. CNV – вид генетического полиморфизма, возникающий в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. Результатом вариации может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена – белка или некодирующей РНК [5].

В работах Chen Z. [6] и Y.-D. Wang [7] было установлено, что изменение степени экспрессии генетических локусов *OCT4* и *SOX2* может рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров малигнизации тканей желудка. Ген *OCT4* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эм-

бриональных стволовых клеток и широко используется как маркер для недифференцированных клеток. Нокдаун гена *OCT4* вызывает дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека. Белок *OCT4* образует гетеродимер с белком *SOX2*. *SOX2* связывается с ДНК совместно с *OCT4* в непалиндромной последовательности, чтобы активировать транскрипцию ключевых факторов плюрипотентности [8]. Удивительно, но регулирование энхансеров *OCT4-SOX2* может происходить без *SOX2*, вероятно, за счет экспрессии других *SOX* белков. Тем не менее группа исследователей пришла к выводу, что основная роль *SOX2* в эмбриональных стволовых клетках – контролировать экспрессию *OCT4*, и оба этих гена поддерживают экспрессию друг друга [9].

Опухолевые клетки характеризуются измененными сигнальными путями, обеспечивающими, в частности, приобретение независимых или автономных сигналов к росту и неограниченного потенциала к пролиферации [10].

Поэтому целью нашего исследования стало изучение изменения относительной копийности генетических локусов *OCT4* и *SOX2* при малигнизации тканей желудка.

Материалы и методы исследования

Клиническим материалом для исследования послужили ткани (опухолевые и условно здоровые) 29 пациентов Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом рак желудка: аденокарциномы G1-G2 (15 пациентов), G3 (5 пациентов), перстневидноклеточным раком (5 пациентов) и смешанного типа (аденокарцинома G3-перстневидноклеточный рак) (4 пациента). Образцы тканей были получены в процессе хирургического вмешательства в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте (РНИОИ) с 2013 по 2014 гг. 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 после проведения патолого-морфологического исследования классифицировали на две группы: опухолевые (малигнизированные) и контрольные (не малигнизированные) образцы.

Получение препаратов геномной ДНК

Геномную ДНК экстрагировали из свежзамороженных операционных биоптатов тканей желудка с использованием лизирующего SDS-содержащего буфера в присутствии протеиназы-К и последующей

фенол-хлороформной экстракцией [11]. 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 (RT-qPCR)

RT-qPCR используется для оценки относительной копийности генов наряду с другими методами [12]. Принцип метода заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референтного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении дозы гена делается на основании анализа соотношения сигналов, продуцируемых амплификатами изучаемой и референтной последовательностей, относительная величина определяется методом ΔCt [13]. Прямые и обратные праймеры были разработаны с использованием референтных последовательностей ДНК NCBI GenBank (таблица). Каждые 25 мкл ПЦР-смеси для анализа содержали 10 нг геномной ДНК, 0,2 mM dNTP's, по 100 нМ прямого и обратного праймеров для референтного гена или гена-мишени, 2,5 mM MgCl₂, ПЦР-буфер, 0,05 u/μl ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* («Синтол», Россия). В качестве красителя использовали SYBR®Green I (Invitrogen, США). Амплификация каждой из проб осуществлялась в трех повторностях.

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 с, 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* [14] 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 ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ (исследуемого гена) – $Ct(B2M)$). Относительную копийность генетического локуса (RQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct}$. Далее вычисляли медиану [15] RQ_{on} опухолевых образцов и медиану RQ_k контрольных (условно нормальная ткань) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копийности генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани желудка: RQ_{on}/RQ_k .

Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и Statistica 8.0. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна – Уитни [15] для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$.

Праймеры для определения относительной копийности генов

№ п/п	Наименование	№ NCBI GenBank	Хромосомная локализация
1.	<i>B2M</i>	NM_004048.2	15q21-q22.2
2.	<i>OCT4 (POU5F1)</i>	NM_001285987.1	6p21.31
3.	<i>SOX2</i>	NM_003106.3	3q26.3-q27

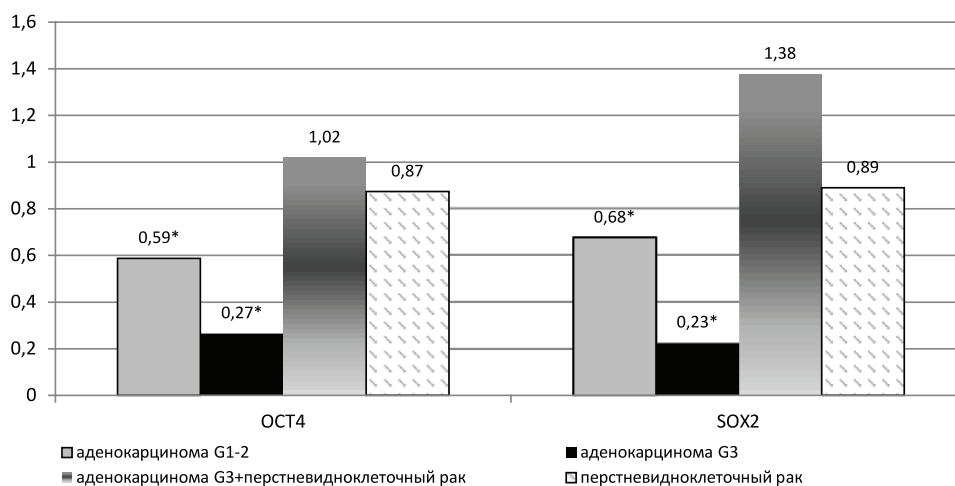
**Результаты исследования
и их обсуждение**

Приблизительно 90% всех случаев рака желудка – это аденокарциномы эпителиального происхождения [16]. Желудочные аденокарциномы различаются по степени дифференцировки их клеток на высоко-, умеренно- (соответственно стадии G 1-2) и низкодифференцированные аденокарциномы (стадия G3). Для высокодифференцированных опухолей характерно строение клеток, близкое строению клеток нормальной ткани, из которой образовалась данная опухоль. В случае средне- и малодифференцированных опухолей сходство структуры клеток в опухоли и исходной ткани снижается, становится «стёртым». В рамках настоящего исследования у пациентов с аденокарциномой желудка стадии G 1-2 обнаружено достоверное ($p < 0,05$) снижение относительной копийности генов *OCT4* и *SOX2* в опухолевой ткани желудка по сравнению с нормальной тканью на 41% и 32% соответственно (рисунок). У пациентов с аденокарциномой желудка (стадия G3) также обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение копийности *OCT4* и *SOX2* на 73,5 и 77,4% соответственно. Полученные результаты являются весьма интересными, потому как и *OCT4* и *SOX2* являются маркерами недифференцированных клеток, и предполагаемым результатом было бы увеличение их копийности в опухолевой ткани желудка по мере дедифференцировки опухолевых клеток. Данный эффект можно объяснить возможными мутациями нуклеотидных последовательностей локусов, к которым были

подобраны праймеры. Эти мутации могут изменить эффективность взаимодействия праймеров с ДНК-матрицей, что приводит к понижению наработки продукта амплификации, а при расчетах – к проявлению снижения относительной копийности генов в низко-дифференцированной опухолевой ткани по сравнению с нормальной. Правда, следует отметить, что и в этом случае можно говорить о понижении относительной копийности нормальной матрицы генетического локуса. Поэтому постепенное снижение относительной копийности нормальной матрицы генов *OCT4* и *SOX2* при переходе от нормальной ткани к аденокарциноме желудка стадии G 1-2 и далее к аденокарциноме желудка стадии G3 может служить маркером как малигнизации ткани, так и разной стадии этого процесса.

При смешанном типе рака (аденокарцинома G3+ перстневидноклеточный рак) обнаружена только тенденция к амплификации гена *SOX2* и отсутствие изменения копийности *OCT4* по сравнению с условно нормальной тканью желудка. Эти данные согласуются с литературными, согласно которым при некоторых видах рака, в частности при плоскоклеточном раке легких, наблюдается увеличение числа копий гена *SOX2* [17].

Перстневидноклеточный рак желудка – одна из гистологических форм желудочной карциномы. При раке желудка перстневидноклеточного типа достоверных изменений копийности генов *OCT4* и *SOX2* относительно условно нормальной ткани желудка не обнаружено, относительная копийность этих генов находится на одинаковом уровне (рисунок).



Изменение копийности генов OCT4 и SOX2 при разных гистологических типах рака желудка (отмечены статистически достоверные отличия для порогового уровня $p < 0,05$)*

Таким образом, наше исследование показало, что изменение относительной копийности генов *OCT4* и *SOX2* можно использовать

в качестве молекулярного биомаркера, позволяющего дифференцировать аденокарциномы G1-2 и G3 от других гистологических

типов рака желудка. Полученные данные свидетельствуют об интенсивном мутационном процессе в генетических локусах *OCT4* и *SOX2* и сонаправленном изменении копийности этих генов при рассматриваемых гистологических типах рака желудка.

Список литературы

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. 1973. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – 2-е изд. – Л: Медицина, 1973. – 141 с.

2. Корниенко И.В., Вололажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. – Ростов-на-Дону: ООО «Ростиздат», 2001.

3. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. – М., 2013. – С. 230.

4. Chambers I., Tomlinson S.R. (July 2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136 (14): 2311–22. doi:10.1242/dev.024398.PMC 2729344. PMID 19542351.

5. Chen Z., Xu W.R., Qian H., Zhu W., Bu X.F., Wang S., Yan Y.M., Mao F., Gu H.B., Cao H.L., Xu X.J. Oct4, a novel marker for human gastric cancer // *J Surg Oncol.* – 2009. – № 99(7). – P. 414–419.

6. Dicken B.J., Bigam D.L., Cass C., Mackey J.R., Joy A.A., Hamilton S.M. Gastric Adenocarcinoma Review and Considerations for Future Directions // *Ann Surg.* – 2005. – № 241(1). P. 27–39.

7. Livak K.J., Schmittgen T.D. *Methods.* – 2001. – № 25. – P. 402–408.

8. Nadauld L., Regan J.F., Miotkel L., Pai R.K., Longacre T.A., Kwok S.S., Saxonov S., Ford J.M., Ji H.P. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors with Droplet Digital PCR // *Transl Med.* – 2012. – № 2. – P. 1–5.

9. Smith M.G., Hold G.L., Tahara E., El-Omar E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – № 12(19). – P. 2979–2990.

10. Souza C.R.T., Leal M.F., Calcagno D.Q., Sozinhos E.K.C., Borges B.N., Montenegro R.C., Ribeiro dos Santos A.K.C., Batista dos Santos S.E., Ribeiro H.F., Assumpcao P.P., Smith M.A.C., Burbano R.R. 2013. MYC Deregulation in Gastric Cancer and Its Clinicopathological Implications. *PLOS ONE*. 8, e64420.

11. Sasaki H., Yokota K., Hikosaka Y., Moriyama S., Yano M., Fujii Y. 2012. Increased Sox2 copy number in lung squamous cell carcinomas. *Exp Ther Med.* 1, 44–48.

12. Jemal A., Bray F., Center M.M. et al. Global cancer statistics // *Cancer Journal for Clinicians.* – 2011. – № 61, № 2. – P. 69–90.

13. Junnila S., Kokkola A., Karjalainen-Lindsberg M., Puolakkainen P., Monni O. Genome-wide gene copy number and expression analysis of primary gastric tumors and gastric cancer cell lines // *BMC Cancer.* – 2010. – P. 2–11.

14. Jump up Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. (June 2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9 (6): 625–35. doi:10.1038/ncb1589. PMID 17515932.

15. Wang Y.-D., Cail N., Wu X.-L., Cao H.-Z., Xie L.-L., Zheng P.-S. 2013. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death and Disease*. 4, 1–10.

16. Wisniewski F., Calcagno D.Q., Leal M.F., dos Santos L.C., Gigeck Cde O., Chen E.S., Pontes T.B., Assumpção P.P., de Assumpção M.B., Demachki S., Burbano R.R., Smith Mde A. 2013. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. *World J Gastroenterol.* 19(41), 7121–7128.

17. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. 2006. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J. Clin. Pathol.* 59(8), 790–800.

References

1. Gubler E.V., Genkin A.A. 1973. *Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh.* Izdanie 2-e. L: Meditsina, 1973. 141 p.

2. Kornienko I.V., Vodolazhskiy D.I., Veyko V.P., Scherbakov V.V., Ivanov P.L. 2001. *Podgotovka biologicheskogo materiala dlya molekulyarno-geneticheskikh identifikatsionnykh issledovaniy pri massovom postuplenii neopoznannykh tel.* Rostov-na-Donu: OOO «Rostizdat».

3. *Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2012 godu.* 2013. Pod redaktsiey Kaprina A.D., Starinskogo V.V., Petrovov G.V. FGBU «MNIОI im. P.A. Gertsena» Minzdrava Rossii: Moskva, pp. 230.

4. Chambers I, Tomlinson SR (July 2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136 (14): 2311–22. doi:10.1242/dev.024398.PMC 2729344. PMID 19542351.

5. Chen Z., Xu W.R., Qian H., Zhu W., Bu X.F., Wang S., Yan Y.M., Mao F., Gu H.B., Cao H.L., Xu X.J. 2009. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol.* 99(7), 414–419.

6. Dicken B.J., Bigam D.L., Cass C., Mackey J.R., Joy A.A., Hamilton S.M. 2005. Gastric Adenocarcinoma Review and Considerations for Future Directions. *Ann Surg.* 241(1), 27–39.

7. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. *Methods.* 25, 402–408.

8. Nadauld L., Regan J.F., Miotkel L., Pai R.K., Longacre T.A., Kwok S.S., Saxonov S., Ford J.M., Ji H.P. 2012. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors with Droplet Digital PCR. *Transl Med.* 2, 1–5.

9. Smith M.G., Hold G.L., Tahara E., El-Omar E.M. 2006. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 12(19), 2979–2990.

10. Souza C.R.T., Leal M.F., Calcagno D.Q., Sozinhos E.K.C., Borges B.N., Montenegro R.C., Ribeiro dos Santos A.K.C., Batista dos Santos S.E., Ribeiro H.F., Assumpcao P.P., Smith M.A.C., Burbano R.R. 2013. MYC Deregulation in Gastric Cancer and Its Clinicopathological Implications. *PLOS ONE*. 8, e64420.

11. Sasaki H., Yokota K., Hikosaka Y., Moriyama S., Yano M., Fujii Y. 2012. Increased Sox2 copy number in lung squamous cell carcinomas. *Exp Ther Med.* 1, 44–48.

12. Jemal A., Bray F., Center M.M. et al. 2011. Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians.* 61, № 2, 69–90.

13. Junnila S., Kokkola A., Karjalainen-Lindsberg M., Puolakkainen P., Monni O. 2010. Genome-wide gene copy number and expression analysis of primary gastric tumors and gastric cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2–11.

14. Jump up Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. (June 2007). «Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells». *Nat. Cell Biol.* 9 (6): 625–35. doi:10.1038/ncb1589. PMID 17515932.

15. Wang Y.-D., Cail N., Wu X.-L., Cao H.-Z., Xie L.-L., Zheng P.-S. 2013. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death and Disease*. 4, 1–10.

16. Wisniewski F., Calcagno D.Q., Leal M.F., dos Santos L.C., Gigeck Cde O., Chen E.S., Pontes T.B., Assumpção P.P., de Assumpção M.B., Demachki S., Burbano R.R., Smith Mde A. 2013. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. *World J Gastroenterol.* 19(41), 7121–7128.

17. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. 2006. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J. Clin. Pathol.* 59(8), 790–800.

Рецензенты:

Непомнящая Е.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

Франциянц Е.М., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 07.10.2014.