

УДК 577.21 : 616 – 006.6

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОЙ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ РАКОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Глущенко Е.С., Антонова А.В., Свеколкин В.П., Мякишева С.К.,  
Федотова С.В., Слесарев С.М., Саенко Ю.В.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,  
Ульяновск, e-mail: JaneG1411@yandex.ru

Исследование направлено на поиск генов, экспрессия которых имеет одинаковую динамику после радиационного воздействия в радиорезистентной (K562) и радиочувствительной (HCT116p) раковых клеточных линиях и анализ количественной активации сигнальных путей, участниками которых являются эти гены. Анализ экспрессии генов проводился через 1, 12 и 24 часа после радиационного облучения в дозе 4 Грея. С помощью программы авторской Gene\_Selector были отобраны гены, удовлетворяющие заданным условиям. Сигнальные пути, в которых задействованы отобранные гены, определялись с использованием программы PANTHER. Количественная оценка активации сигнальных путей оценивалась с помощью метода Oncofinder. Найдено 5 общих сигнальных путей, но их активация в радиорезистентной и радиочувствительной раковых клеточных линиях значительно отличается. Несмотря на многоступенчатый отбор по сходству адаптивного ответа радиорезистентной и радиочувствительной клеточной линии на радиационное воздействие активация этих сигнальных путей имеет различную динамику и направленность.

**Ключевые слова:** ген, экспрессия генов, генные мутации, рак, радиационное излучение, радиорезистентность

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE ACTIVATION OF SIGNALING PATHWAYS OF RADIORESISTANT AND RADIOSENSITIVE CANCER CELL LINES

Gluschenko E.S., Antonova A.V., Svekolkina V.P., Myakisheva S.K.,  
Fedotova S.V., Slesarev S.M., Saenko Y.V.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: JaneG1411@yandex.ru

The purpose of study is a finding of genes whose expression has the same dynamics after exposure to radiation in radioresistant (K562) and radiosensitive (HCT116p) cancer cell lines and quantitative analysis of the activation of signaling pathways in which these genes are involved. Gene expression analysis was performed after 1, 12 and 24 hours after exposure to radiation at a dose of 4 Gray. With the program Gene\_Selector were selected genes that meet certain conditions. Signaling pathways that involve selected genes were determined using the program PANTHER. Activation of signaling pathways was assessed using the method of Oncofinder. It was found 5 common signaling pathways, but their activation in radioresistant and radiosensitive tumor cell lines is significantly different. Despite the selection by the similarity of the adaptive response of two cancer cell lines to the radiation the activation of these signaling pathways have different dynamics and orientation.

**Keywords:** gene, gene expression, gene mutations, cancer, radiation emissions, radioresistance

Проблема радиорезистентности раковых опухолей, несмотря на накопленный объем знаний, о механизмах развития противоопухолевых эффектов, остается одной из основных для онкологии. Известно, что индукция первичных изменений, вызывающих резистентность опухолей к повреждающим воздействиям, происходит, как на молекулярном, так и на клеточном уровне: взаимодействие с мишенями, блокирование отдельных внутриклеточных процессов, нарушение контроля клеточного цикла, апоптоза [1]. Не исключено участие данных изменений и на более высоких уровнях организации живой материи (межклеточные взаимодействия, ткань, системы органов, организм) [4]. Радиорезистентность опухолей – это явление, в основе которого лежит ряд молекулярных изменений, что в свою очередь формирует чувствительность раковых клеток к радиотерапии. Специфи-

ческие и типовые молекулярные процессы, которые определяют ответ клетки на стресс, в том числе на токсическое или радиационное воздействие, связаны с широким диапазоном реакций – от ограничения накопления химиопрепарата внутри клетки до отмены программы гибели клетки, индуцируемой повреждающим воздействием [5]. Устойчивость раковых клеток формируется под влиянием стрессовых воздействий, в том числе в результате применения радиотерапии. Резистентность формируется на разных «ступенях» воздействия на клетку, причем на каждой «ступени» задействованы различные молекулы [6, 13]. Известно, что после MDR-трансфекции клоны лейкозной клеточной линии K-562 обнаружили повышенную устойчивость к радиации и что под влиянием ионизирующего излучения на опухолевые клетки различного гистогенеза экспрессия P-gp, MRP1 и LRP

может усилиться. Поэтому причинами формирования радиорезистентности раковых опухолей являются изменение экспрессии генов и степень активации сигнальных путей, в которых они участвуют.

В большинстве транскриптомных исследований основной задачей являлся поиск генов которые дифференциально экспрессируются в экспериментальной и контрольной группе. После выявления этих генов, обычно делалось заключение о том, что тот или иной дифференциально-экспрессирующийся ген может принимать участие в формировании адаптивного ответа к экспериментальному воздействию [12]. Аналогичные работы можно найти и при исследовании радиорезистентности раковых опухолей [16]. В подобных исследованиях не учитывается то, что гены и их транскрипты являются частью сигнальных путей, состоящих из десятков и сотен взаимодействующих единиц. Кроме этого, гены, кодирующие сигнальные белки включены во множество сигнальных путей [15]. Для учета этих факторов необходимо оценивать количественную активацию сигнальных путей, компонентами которых являются дифференциально экспрессирующиеся гены. Недавно был разработан метод Oncofinder, который позволяет оценить количественно активацию сигнальных путей [7].

**Цель настоящей работы** – поиск генов, экспрессия которых имеет одинаковую динамику после радиационного воздействия в радиорезистентной и радиочувствительной раковых клеточных линиях и анализ количественной активации сигнальных путей, участниками которых являются эти гены.

#### **Материал и методы исследования**

Использовали радиорезистентную (K562) раковую клеточную линию хронического миелолейкоза и клеточную линию рака прямой кишки человека HCT-116 с нормальным геном TP53 – HCT116p. Клетки облучали рентгеновским излучением, генерируемым терапевтическим акселератором Cliniac 600 при комнатной температуре в дозах 4 Грэй одноразово. Клетки облучались в 24 луночных планшетах (объем лунки 2,5 мл). Профили экспрессии генов в клетках K562 и HCT116p, облученных в дозе 4 Гр, изучали через 1, 12 и 24 часа после облучения с использованием микроматрицы Affymetrix серии HGU133A.

РНК выделяли из  $3 \cdot 10^6$  клеток с использованием набора для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя. Целостность выделенной РНК проверяли с использованием биоанализатора Agilent 2100 по целостности 18S и 28S рибосомальной. Библиотеку клонированных ДНК готовили с использованием набора GeneChipExpression 3'-Amplification One-CyclecDNASynthesisKit. Мечение биотином анти-смысловых библиотек клонированных РНК и очистка были проведены с использованием набора GeneChipExpression 3'-Amplification Reagentsfor IVT

Labeling в соответствии с протоколом производителя. Количество полученной РНК и ДНК оценивалось спектрофотометрически с использованием спектрофотометра NanoDrop. Фрагментацию кРНК проводили при 94°C в термоциклере в течение 35 минут. Синтезированные биотинилированные кРНК вначале гибридизировали с контрольной матрицей «Test-3» с целью оценки качества полученных кРНК. Если качество биотинилированных кРНК соответствовало расчётному, то тогда проводили гибридизацию с матрицей HGU133A. Матрицу окрашивали стрептовидин-фикоэритрином. Окрашенную матрицу отмывали от несвязавшегося белка и сканировали на сканере GeneArray G2500A.

Отбор генов, чья экспрессия увеличивалась или уменьшалась по отношению к контролю на протяжении всего эксперимента, проводился с использованием программы Gene Selector (программу можно получить у авторов статьи), достоверность отличий задавалась на уровне  $p\text{-Value} \leq 0,05$ .

Определение сигнальных путей, к которым относятся отобранные гены, проводилось с использованием программы PANTHER [2], базы данных Qiagen SABiosciences [3]. Количественную активацию сигнальных путей выполняли с использованием метода Oncofinder [7].

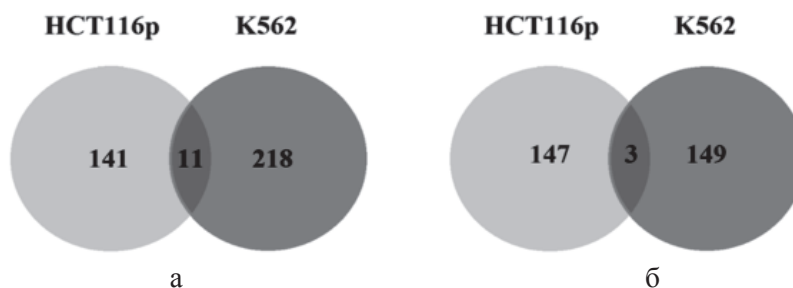
#### **Результаты исследования и их обсуждение**

На рис. 1, а показано, что в радиорезистентной (K562) раковой клеточной линии 218 генов характеризуются повышенной экспрессией на протяжении всего эксперимента, а в радиочувствительной (HCT116p) раковой клеточной линии 141 сверхэкспрессирующихся генов. Общими для них являются 11 генов (CROCCP2, CDK1, GRB10, SLC2A3, PSRC1, SLC2A3, FANCE, MARS, NDC80, NAA35, CAP1). На рис. 1, б в радиорезистентной (K562) раковой клеточной линии найдено 149 генов, а в радиочувствительной (HCT116p) раковой клеточной линии 147 генов, чья экспрессия снижается и достигает своего минимального значения после 24 часов эксперимента. Среди них 3 гена (PRSS3, CREBL2, VPS26A), которые являются общими для радиорезистентной (K562) и радиочувствительной (HCT116p) клеточных линий. Таким образом, повышенная экспрессия одних и сниженная экспрессия других генов в радиорезистентной (K562) раковой клеточной линии может быть связана с мутациями в этих генах. Следствием этого является формирование высокой радиорезистентности раковых клеток.

Количественный анализ экспрессии генов позволяет получить новую информацию о молекулярной природе опухоли. Однако данные профилей экспрессии генов, зачастую являются противоречивыми, т.к. при обработке результатов учитывается экспрессия генов самих по себе, а не в контексте биологических процессов, за которые они

отвечают. Так, все гены можно разделить на ансамбли – внутриклеточные сигнальные пути [7]. Сети сигнальных путей в клетке многочисленны и сложны. Они способны взаимодействовать и влиять друг на друга. Изменение одного компонента сигнального пути, например сверхэкспрессия гена, способно нарушить функционирование всей системы и стать причиной формирования радиорезистентности. Например, сверхэкспрессия EGFR часто встречается в опухолях человека.

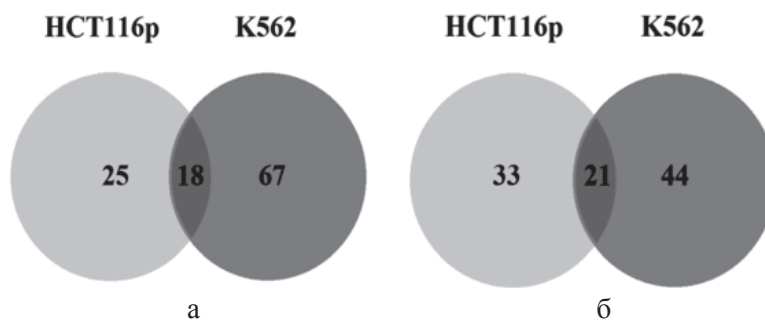
В большом числе исследований подчеркивается связь между EGFR и устойчивостью опухоли к ионизирующим излучениям. Nuamaní и соавт. продемонстрировали, что раковые клетки предстательной железы (DU145 и PC-3) экспрессируют EGFR [8, 9, 14]. Более того, в преclinical исследованиях была обнаружена корреляция экспрессии EGFR с пролиферацией, ангиогенезом и миграцией опухолевых клеток, а также с радиорезистентностью опухоли [10, 11].



*Рис. 1. Количество общих генов в радиорезистентной (K562) и радиочувствительной раковых клеточных линиях (HCT116p): а – количество общих генов, чья экспрессия растет на протяжении всего эксперимента, в радиорезистентной раковой клеточной линии K562 и радиочувствительной раковой клеточной линии HCT116p; б – количество общих генов, чья экспрессия снижается на протяжении всего эксперимента, в радиорезистентной раковой клеточной линии K562 и радиочувствительной раковой клеточной линии HCT116p*

Внутриклеточные механизмы, в которых функционируют отобранные гены в радиорезистентной (K562) и радиочув-

ствительной (HCT116p) раковых клеточных линиях определяются с помощью онлайн программы PANTHER.



*Рис. 2. Общие сигнальные пути для радиорезистентной (K562) и радиочувствительной (HCT116p) раковых клеточных линий: а – общие сигнальные пути для двух раковых клеточных линий, в которые включены гены, чья экспрессия увеличивалась на протяжении 1, 12 и 24 часов; б – общие сигнальные пути для двух раковых клеточных линий, в которые включены гены, чья экспрессия снижается на протяжении 1, 12 и 24 часов*

На рис. 2 показано количество сигнальных путей, в которых задействованы отобранные гены и количество общих сигнальных путей для радиорезистентной (K562) и радиочувствительной (HCT116p) раковых клеточных линий. Для расчета активации сигнальных путей отобрано пять (EGF receptor signaling pathway, Apoptosis signaling pathway, FGF signaling pathway, Gonadotropin

releasing hormone receptor pathway, Huntington disease), которые являются общими для двух раковых клеточных линий в случае, когда происходит повышение (рис. 2, а) и снижение (рис. 2, б) экспрессии генов на протяжении всего эксперимента.

В табл. 1, 2 приведены данные активации сигнальных путей в двух раковых клеточных линиях.

Таблица 1

Активация сигнальных путей в радиочувствительной раковой клеточной линии НСТ116р в течение 1, 12 и 24 часов после ионизирующего излучения

Сигнальные пути	НСТ 116р 1 час	НСТ 116р 12 часов	НСТ 116р 24 часа
1. EGF receptor signaling pathway	2,4361	-13,654	-5,8752
2. Apoptosis signaling pathway	5,1936	3,2807	6,7716
3. FGF signaling pathway	-6,5782	-11,7453	3,9147
4. Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	-12,2643	-21,4517	-9,1085
5. Huntington disease	0,9516	8,2162	15,6322

Таблица 2

Активация сигнальных путей в радиорезистентной раковой клеточной линии К562 в течение 1, 12 и 24 часов после ионизирующего излучения

Сигнальные пути	К562 1 час	К562 12 часов	К562 24 часа
1. EGF receptor signaling pathway	-2,902	-5,2527	6,7421
2. Apoptosis signaling pathway	0,0887	3,1617	-1,8798
3. FGF signaling pathway	-1,7543	1,5256	7,9806
4. Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	-3,6758	0,95	8,0356
5. Huntington disease	-0,5998	3,2712	-1,8408

Активация сигнальных путей в радиорезистентной (К562) и радиочувствительной (НСТ 116р) раковых клеточных линиях кардинально отличается. Сигнальные пути EGF receptor signaling pathway и Gonadotropin releasing hormone receptor pathway в радиочувствительной (НСТ 116р) раковой клеточной линии имеют отрицательное значение активации (-5,8752; -9,1085) после 24 часов эксперимента, а в радиорезистентной (К562) раковой клеточной линии активация имеет положительное значение (6,7421; 8,0356). В Apoptosis signaling pathway и Huntington disease активация сигнальных путей имеет относительно высокие показатели в радиочувствительной раковой клеточной линии (6,7716; 15,6322) и минимальные значения в радиорезистентной раковой клеточной линии (-1,8798; -1,8408) после окончания эксперимента. Характер активации сигнального пути FGF signaling pathway в двух раковых клеточных линиях имеет схожую тенденцию к росту, но значения в радиорезистентной раковой клеточной линии выше (7,9806), чем в радиочувствительной раковой клеточной линии (3,9147). Эти данные доказывают, что при анализе транскриптома необходимо учитывать не только экспрессию отдельных генов, но и учитывать их работу в совокупности, т.к. изменение экспрессии одного гена способно привести к изменению функционирования всей системы генома.

### Заключение

Таким образом, найдены общие гены для радиорезистентной (К562) и радиочувствительной (НСТ116р) раковых клеточных линий, чья экспрессия растет или падает на протяжении всего эксперимента. В результате последующего анализа обнаружены общие сигнальные пути, компонентами которых являются отобранные гены и отобрано 5 сигнальных путей, характерных для обеих клеточных линий. Количественный анализ активации сигнальных путей продемонстрировал, что, несмотря на многоступенчатый отбор по сходству адаптивного ответа радиорезистентной и радиочувствительной клеточной линии на радиационное воздействие, активация этих сигнальных путей имеет разную динамику и направленность.

*Результаты получены в рамках программы «УМНИК» и в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки РФ.*

### Список литературы

1. Бутенко З.А. Современные подходы к терапии рака // Онкология. – 2000. – Т. 2, № 1–2. – С. 141–143.
2. База данных PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pantherdb.org/> (дата обращения: 21.10.14).
3. Онлайн – сервис Qiagen SABiosciences [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.qiagen.com/ru/> (дата обращения: 23.10.14).
4. Свирновский А.И. Адаптация нормального кроветворения к факторам окружающей среды и устойчивость лейкоэмических клеток к ятрогенным воздействиям: эволюционные аспекты и проблемы терапии // Медицинские новости. – 2003. – № 7. – С. 28–31.

5. Bible K.C. et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2000. – Vol. 6. – P. 661–670.
6. Bruno A.P., Laurent G., Averbeck D., Demur C., Bonnet J., Bettaieb A., Levade T., Jaffrezou J.P. Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leucemic cells resistant to ionizing radiation // *Cell Death & Differentiation*. – 1998. – Vol. 5. – P. 172–182.
7. Buzdin A.A., Zhavoronkov A.A., Korzinkin M.B. et al. Oncofinder, a new method for the analysis of intracellular signaling pathway activation using transcriptomic data // *Frontiers in genetics*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–4.
8. Chinnaiyan P., Varambally S., Tomlins S.A. Enhancing the antitumor activity of ErbB blockade with histone deacetylase (HDAC) inhibition // *International Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 118. – P. 1041–1050.
9. Corvo R., Pastrone I., Scolaro T. et al. Radiotherapy and oral capecitabine in the preoperative treatment of patients with rectal cancer: rationale, preliminary results and perspectives // *Tumor*. – 2003. – Vol. 89. – P. 361–367.
10. Milas L., Fan Z., Andratschke N. et al. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies // *International Journal of Radiation Oncology – Biology – Physics*. – 2004. – Vol. 58. – P. 966–971.
11. Nasu S., Ang K.K., Fan Z. et al. C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability // *International Journal of Radiation Oncology – Biology – Physics*. – 2001. – Vol. 51. – P. 474–477.
12. Olbryt M., Habryka A., Tyszkiewicz T. et al. Global Gene Expression Profiling in Three Tumor Cell Lines Subjected to Experimental Cycling and Chronic Hypoxia // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – P. 1–11.
13. Sarkadi B. // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P. 1179–1236.
14. Sheikh S.S., Domin J., Abel P., et al. Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF // *Neoplasia*. – 2004. – Vol. 6. – P. 846–853.
15. Gustincich S., Sandelin A. et al. The complexity of the mammalian transcriptome // *The Journal of Physiology*. – 2006. – Vol. 575. – P. 321–332.
16. Wilson George D., Bryan J. et al. Gene expression changes during repopulation in a head and neck cancer xenograft // *Radiotherapy and Oncology*. 19.09.2014 URL: <https://mail.rambler.ru/#/folder/INBOX/9515/> (дата обращения: 17.10.14).

**References**

1. Butenko Z.A. *Sovremennye podhody k terapii raka* // *Oncologija*. 2000. T. 2, no. 1–2. pp. 141–143.
2. Baza dannyh PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships [Jelektronnyj resurs]). Rezhim dostupa: <http://www.pantherdb.org/> (data obrashhenija: 21.10.14).
3. Onlajn servis Qiagen SABiosciences [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.qiagen.com/ru/> (data obrashhenija: 23.10.14).
4. Svirnovskij A.I. Adaptacija normal'nogo krovotvorenija k faktoram okruzhajushhej sredy i ustojchivost' lejkemicheskikh kletok k jatrogennym vozdeystvijam: jevoljucionnye aspekty i problemy terapii // *Medicinskie novosti*. 2003. no. 7. pp. 28–31.

**Рецензенты:**

Балыкин М.В., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой адаптивной физической культуры Института медицины, экологии и физической культуры, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;  
 Светухин В.В., д.ф.-м.н., профессор, научный руководитель научно-исследовательского технологического института УлГУ, г. Ульяновск.  
 Работа поступила в редакцию 05.12.2014.