

ООО НТЦ "Биоклиникум"
ГБОУ школа №1543

Влияние экспрессии генов *ELOVL5* и *IGFBP6* на миграцию и клеточную адгезию линии клеток рака молочной железы

Лысаковская А.Б.
Научный руководитель: А.А. Полозников

Москва
2018

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – это злокачественная опухоль железистой ткани молочной железы, является ведущей онкологической патологией у женского населения России (20,9%) (Рисунок 1) (Каприн и др., 2018). Это заболевание поражает женщин в возрасте от 13 до 90 лет во всем мире, но в России чаще всего этому заболеванию подвержены женщины после 40 лет (средний возраст – 61,3 года (Каприн и др., 2017)). Риск умереть от данного недуга среди заболевших на ранних стадиях составляет 1,7%, а кумулятивный риск* его развития – 5,77%.

*Кумулятивный риск – это вероятность развития неблагоприятного эффекта в результате одновременного поступления в организм химических веществ, обладающих сходным механизмом действия всеми возможными путями.

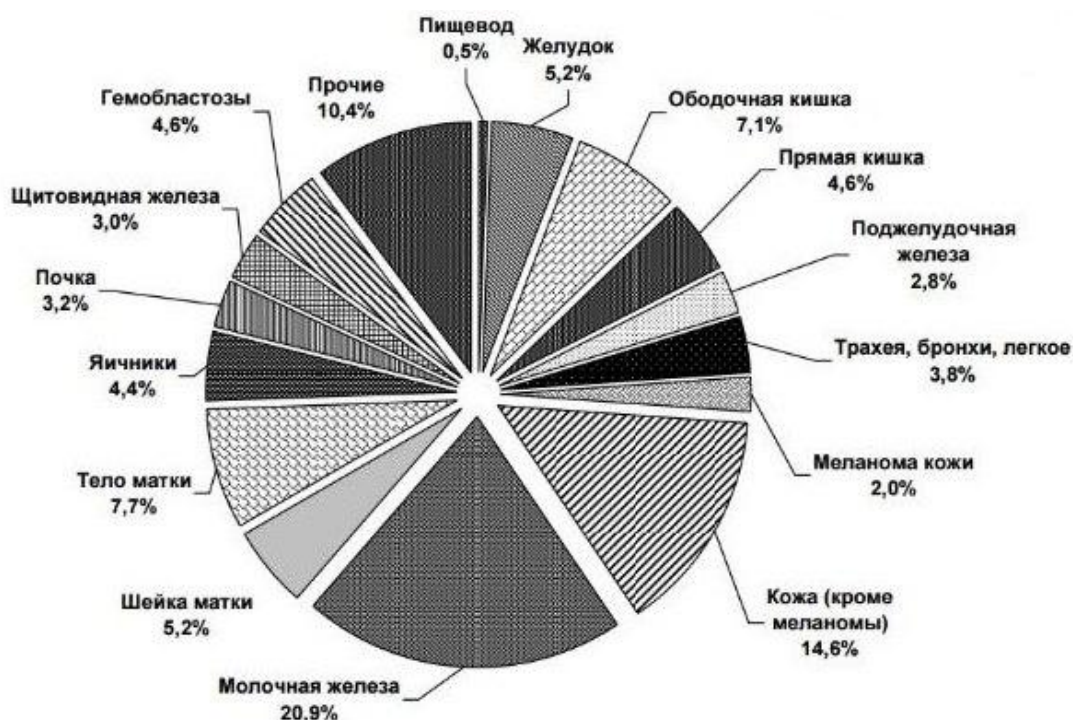


Рисунок 1. Структура заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения России в 2015 году (Каприн и др., 2017).

В мире самые высокие показатели заболеваемости зарегистрированы в Австралии (103 на 100 000 человек), США (93/100 000) и Швейцарии (98/100 000), низкие – в странах Востока – Китай (26/100 000) и Япония (27/100 000). Самая высокая смертность наблюдается в таких странах, как Дания (29,4/100 000), Нидерланды (29,7/100 000), Великобритания (27,5/100 000), низкая – у Японии (7,9/100 000) и Китая (4,7/100 000).

Стоит отметить, что показатели заболеваемости и распространенности возрастают в среднем за год на 2%. Это может быть обусловлено усилением воздействия неблагоприятных факторов на организм, ухудшением экологии,

но еще и улучшением диагностики и увеличением числа обследуемых женщин, что помогает выявить заболевание на более ранней стадии, также важным фактором является увеличение продолжительности жизни и доли пожилых людей.

Основной причиной смерти от РМЖ является метастазирование - образование вторичных опухолей в результате распространения раковых клеток из первичной опухоли в другие ткани. Процесс метастазирования объясняет теория метастатического каскада. Она предполагает, что раковая клетка проходит цепь изменений или перестроек, которые обеспечивают ее перемещение к отдаленным органам. Для этого опухолевая клетка должна обладать определенными качествами, позволяющими ей проникать в прилежащие ткани и просветы сосудов, быть устойчивой к специфическим и неспецифическим факторам иммунной защиты при попадании в кровоток или ток лимфы, мигрировать в сосуды и прикрепляться к эндотелию сосудов отдаленных органов, отделяться от первичной опухоли и распространяться с током крови или лимфы. Метастатический каскад можно разделить на 5 этапов:

- Инвазия – процесс распространения опухолевых клеток из первичного очага поражения в соседние ткани
- Интравазация – проникновение опухолевых клеток в просвет кровеносного или лимфатического сосуда
- Циркуляция раковых клеток в крови
- Экстравазация – выход опухолевых клеток в периваскулярную ткань
- Колонизация раковыми клетками отдаленного органа и рост метастаза.

В метастазировании важную роль играют такие клеточные процессы как миграция и адгезия. Адгезия – это способность клеток слипаться друг с другом и различными субстратами. При инвазии, интравазации и экстравазации опухолевые клетки теряют свои межклеточные контакты, и у них появляется способность к передвижению. Потом они мигрируют через межклеточный матрикс, прикрепляясь с помощью интегринов к белкам базальной мембраны, осуществляют ее протеолиз. Это позволяет раковым клеткам инвазировать в базальную мембрану сосуда, прикрепляться к его эндотелию, а затем, в результате супрессии адгезивных молекул, отделяться от пласта опухолевых клеток и эндотелия сосудов.

У 6-9% женщин через 2-5 лет после операции по удалению опухоли наблюдается рецидив рака молочной железы (Родионов, 2011). Одна из причин этого – парное взаимодействие генов *ELOVL5* и *IGFBP6*, которые являются маркерами рецидива РМЖ. Считается, что гены, у которых уровни экспрессии отличаются между собой обычно используются для выявления генетического фона, лежащего в основе фенотипических различий между раковыми клетками. Предполагалось, что наборы маркеров могут быть получены путем комбинирования генов с относительно низкой степенью индивидуальной отличительной экспрессии. Ученые разработали метод

построения высокоинформативных комбинаций генов, направленных на максимизацию получения информации и идентифицированных наборов из 2-5 генов, которые эффективно прогнозировали рецидив у пациентов с эстроген-положительным РМЖ. Таким образом было выявлено, что взаимодействие генов *ELOVL5* и *IGFBP6* прогнозирует рецидив (Никулин и др., 2017). Это является взаимодействием, потому что в случае нокдауна одного из них, экспрессия генов, отвечающих за адгезию и миграцию, что может быть причиной рецидива, изменяется.

По данным с сайта Uniprot *ELOVL5* - ген, кодирующий мембранный белок в эндоплазматическом ретикулуме, участвующий в удлинении длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, высоко экспрессирующейся в надпочечниках и яичках

IGFBP6 – ген, кодирующий инсулиноподобный белок, активирующий пролиферацию и тормозящий апоптоз, содействующий миграции раковых клеток, а также высоко экспрессирующийся в гладких мышцах, ганглиях и сетчатке

Целью данной работы является изучение влияния экспрессии генов *ELOVL5* и *IGFBP6* на миграцию и адгезию клеточной линии РМЖ. Для исследования мы сравнивали контрольную клеточную линию и клеточные линии с нокдаунами генов *ELOVL5* и *IGFBP6*. В качестве маркеров для исследования клеточной миграции и адгезии мы использовали гены *VEGFA*, *MMP1*, *ARHGDI1*, *LAMA3*, *CDH11*, *CDH2*, *DSP*.

Материалы и методы

Для того чтобы изучить влияние генов *ELOVL5* и *IGFBP6* на экспрессию генов, в которых закодированы белки, отвечающие за миграцию и клеточную адгезию и за скорость миграции у клеток линии рака молочной железы, были использованы метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), сравнивая контрольную клеточную линию и линии клеток с нокдаунами генов *ELOVL5* и *IGFBP6*.

Нокдаун гена – метод, позволяющий снизить экспрессию одного или нескольких генов при помощи изменения соответствующей последовательности нуклеотидов ДНК либо с помощью олигонуклеотида, комплементарного соответствующей молекуле мРНК. Олигонуклеотид – это короткая последовательность нуклеотидов, получаемая путем химического синтеза или расщеплением более длинных полинуклеотидов, используется в качестве праймеров и зондов. При связывании олигонуклеотида с геном происходит понижение экспрессии, из-за блокировки транскрипции, трансляции или дегградации мРНК. Мы использовали ДНК-микрочип в качестве зонда для нокдауна генов *ELOVL5* и *IGFBP6*.

1. ПЦР в «реальном времени».

Для сравнительного анализа экспрессии генов, отвечающих за клеточную адгезию, проводилась ПЦР «в реальном времени». В качестве стартового материала использовалась комплементарная ДНК (кДНК), полученная методом обратной транскрипции с суммарной РНК, выделенной из контрольной клеточной линии и клеточных линий с нокдаунами генов *ELOVL5* и *IGFBP6*.

Состав реакционной смеси объемом 25 мкл:

Реагент	Объем (мкл)
5×qPCRmix-HS SYBR* (Евроген)	5
Смесь прямого и обратного праймеров (5 мкМ)	1,2
Кднк	2,5
Стерильная деионизированная вода без ДНК-аз и РНК-аз	16,3

*Пятикратная готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген) содержит флуоресцентный краситель Sybr Green, Taq-ДНК полимеразу, ионы Mg^{2+} , буферный раствор и дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs).

Объемы всех реагентов были взяты в соответствии с общим количеством лунок для ПЦР реакции (24+1 в случае семи разведений)

Порядок работы приготовления разведений кДНК:

Семь пробирок для ПЦР поместить на планшет, в одну налить 27 мкл воды и 3 мкл кДНК, в остальные налить 10 мкл воды. Лунку, содержащую кДНК, перемешать с помощью пипетки (забирая и сразу сливая содержимое), затем забрать 20 мкл и поместить в следующую пробирку, повторить процедуру на последующих лунках, затем слить последние 20 мкл. Пробирки закрыть и отложить. Таким образом, получается семь разведений исходной кДНК:

d_10	d_15	d_22,5	d_33,75	d_50,63	d_75,94	d_113,9
------	------	--------	---------	---------	---------	---------

Где d – фактор разведения.

Порядок приготовления реакционной смеси:

В пробирку налить 408 мкл воды, 125 мкл смеси для ПЦР, 230 мкл смеси праймеров, перемешать с помощью вортекса и центрифугировать.

Внести по 22,5 мкл реакционной смеси в 24 лунки 96-луночного планшета, меняя наконечник каждые две лунки, в каждую лунку со смесью внести по 2,5 мкл разведенной кДНК, используя наконечник только один раз. Образец, соответствующий каждому разведению кДНК, поместить в три последовательных лунки (трипликаты).

Схема расположения образцов в планшете:

10	10	10	15	15	15	22,5	22,5	22,5	33,75	33,75	33,75
50,63	50,63	50,63	75,94	75,94	75,94	113,9	113,9	113,9	NC	NC	NC

Где числа соответствуют разведениям кДНК; NC – отрицательный контроль (без добавления кДНК).

Подготовка к реакции:

Заклеить планшет специальной пленкой, вортексировать, центрифугировать 2 минуты со скоростью 4,16 об/мин. ПЦР «в реальном времени» проводить в автоматическом амплификаторе (ДНК технология).

Протокол реакции:

Название	Температура (°C)	Время (мин)	Количество циклов
Предварительная денатурация	94°	10 мин	1
Денатурация	94°	10 сек	40
Отжиг праймеров	64°	20 сек	40
Элонгация	72°	15 сек	40

Во время денатурации происходит расплетение двойной спирали ДНК, затем во время отжига праймеров происходит присоединение праймеров к определенным участкам на денатурированных одинарных цепях ДНК, во время элонгации происходит достраивание новых нуклеотидов к праймерам о матрице ДНК. Значение флуоресценции снимается при каждом цикле. Параллельно записывается кривая плавления в диапазоне 56°C-95,6°C (шаг 0,2°, 6 секунд при каждой температуре, всего 200 циклов).

2. Анализ результатов ПЦР «в реальном времени»

Анализ результатов проводили после окончания ПЦР «в реальном времени». В режиме «Кривая плавления, dF/ dT» проверяли специфичность праймеров, одна пара праймеров должна давать только один продукт (один пик). В режиме «Качественный анализ, Ct» вручную выставляли пороговое значение флуоресценции, отделяя снизу примерно 1/3 экспоненциальной части кривой. Таким образом, получали значения Ct (threshold cycle) для каждой лунки.

Расчет эффективности праймеров

После проведения реакции рассчитывали эффективность праймеров. Для этого копировали значения Ct и переносили данные в Excel. Далее, строили график в котором значения по оси Y соответствовали количеству циклов, а значения по оси X соответствовали десятичному логарифму от значения концентрации ДНК. В идеальном случае график представляет собой прямую линию. С помощью функции «Линия тренда» аппроксимировали полученные данные прямой линией и определяли ее уравнение. Коэффициент наклона прямой в идеальном случае равняется 3,32. В формулу линии тренда в X подставляли наши значения логарифмов. Также проверяли, чтобы показатель R² (величина достоверности аппроксимации) была не ниже 0,95.

По формуле:

$$E = 10^{\frac{-1}{slope}}$$

где E – эффективность, slope – коэффициент наклона.

Идеальная эффективность праймеров характеризуется значением 2. В нашем случае, подходящая пара праймеров обладает эффективностью в диапазоне 1,9-2,1.

Далее считали погрешность эффективности. В формулу линии тренда вместо X подставляли наши значения десятичных логарифмов. Потом из идеального значения вычитали реальное и возводили разность в квадрат. Складывали значения квадратов разностей, полученную сумму делили на количество значений -1 , затем извлекали корень (получаем значение Δa). Далее считаем погрешность по формуле:

$$\Delta E = E * \ln 10 * \frac{1}{a^2} * \Delta a$$

где a - коэффициент наклона прямой аппроксимации, E – эффективность, ΔE – погрешность эффективности.

Результаты

Расчет относительной экспрессии генов, отвечающих за миграцию и клеточную адгезию, был проведен в трех клеточных линиях: с нокдаунами генов *ELOVL5* и *IGFBP6* и контрольной клеточной линии. Расчет проводился в соответствии с формулой $E^{\Delta Ct} / C$, где C – среднее геометрическое для четырех референсных генов. Референсные гены – это гены, экспрессия которых по умолчанию считается постоянной. Для этого мы выбрали гены *ACTB*, *EEF1A1*, *HUWE1* и *SF3A1*. Среднее геометрическое мы рассчитывали по формуле:

$$(E^{\Delta Ct1} \times E^{\Delta Ct2} \times E^{\Delta Ct3} \times E^{\Delta Ct4})^{1/4}$$

Из полученных данных (Таблица 1, рисунок 2) мы видим, что в клеточной линии с нокдауном *IGFBP6* понизилась экспрессия генов *VEGFA*, *DSP*, *LAMA3* и *CDH11* и повысилась экспрессия генов *ARHGD1B* и *MMP1*.

Так как ген *VEGFA* кодирует фактор роста эндотелия сосудов, при повышении экспрессии *VEGFA*, происходит стимуляция ангиогенеза, т.е. роста сосудов, которые обеспечивают кровоснабжение опухоли. Известно, что данный ген также положительно влияет на клеточную миграцию, тем самым обеспечивая появление миграционных свойств раковых клеток, и, как следствие, их метастазирование. Кроме того, *VEGFA* активирует интегрин – белок контактов клеток и внеклеточного матрикса – что также свидетельствует об его положительном влиянии на адгезию и последующее метастазирование раковых клеток. Так как уровень экспрессии гена *VEGFA* понизился, то способность раковых клеток к метастазированию ухудшилась.

Ген *CDH11* кодирует белок кадгерин-11, который является белком-посредником в адгезионных межклеточных контактах, что негативно влияет на прогрессирование опухоли: для того, чтобы клетка была способна к инвазии, ей нужно избавиться от межклеточных контактов. Следовательно, пониженная экспрессия *CDH11* положительно сказывается на метастазировании (Засадкевич, 2013).

Подобное влияние как ген *CDH11* оказывает ген *DSP*, который играет большую роль в функционировании десмосомных контактов. Можно отметить, что уровень экспрессии *CDH11* понизился сильнее остальных, что свидетельствует о возможной компенсации сниженных миграционных свойств раковой клетки при нокдауне *IGFBP6*.

LAMA3 кодирует ламинин $\alpha 3$, который участвует в сборке хемидесмосом, которые обеспечивают прикрепление клетки к внеклеточному матриксу, что положительно сказывается на уровне адгезии. Также, ламинин $\alpha 3$ принимает участие в регуляции клеточной миграции. Таким образом, пониженный уровень экспрессии гена *LAMA3* негативно влияет на проявление миграционных свойств данной клеточной линии.

Очень сильно возрос уровень экспрессии гена *MMP1*, а также повысился

уровень экспрессии гена *ARHGDIB*. Ген *MMP1* кодирует металлопротеиназу 1, которая участвует в расщеплении внеклеточного матрикса для создания каналов инвазии раковых клеток (Tallant, 2010), что является одной из стадий метастатического каскада, что способствует метастазированию (Maskos, 2003). Ген *ARHGDIB*, который играет тормозную роль в пролиферации клеток, экспрессируется больше. Известно, что фермент каспаза-3, которая расщепляет *ARHGDIB* до Δ N-RhoGDI β , экспрессия которого нарушает миграцию раковых клеток, что негативно сказывается на уровне метастазирования. Также известно, что Δ N-RhoGDI β препятствует апоптозу раковой клетки, таким образом способствуя ее выживанию (Fujiwara, 2016). В линии клеток с нокдауном *ELOVL5* понизилась экспрессия генов *CDH2*, *CDH11*, *CD24*, *DSP*, *VEGFA*, повысилась экспрессия генов *ARHGDIB* и *MMP1* и почти не изменилась экспрессия гена *LICAM* (Таблица 2, рисунок 3). *CD24* – гликопротеин, который часто синтезируется в большом количестве во многих типах опухолевых клеток, подвергается интенсивному тканеспецифичному гликозилированию и играет роль в воспалении и злокачественном перерождении клеток. Также известно, что ген *CD24* служит неблагоприятным прогностическим маркером (Jing, 2018), - так как уровень экспрессии *CD24* упал, можно сделать вывод об ухудшении опухолевых свойств у данной клеточной линии.

Как было упомянуто выше, гены *CDH2* и *CDH11* кодируют кадгерин-2 и кадгерин-11 соответственно. Следовательно, пониженная экспрессия этих генов положительно сказывается на прогрессировании опухоли.

Большое повышение относительной экспрессии гена *MMP1* говорит о схожем механизме, наблюдаемом в клеточной линии с нокдауном гена *IGFBP6* – основная функциональная роль гена *ELOVL5* при его нокдауне возможно была компенсирована геном *MMP1*.

Также повысилась экспрессия гена *ARHGDIB*, что оказывает негативное влияние на миграцию раковых клеток, но, в то же время, увеличивает их выживаемость.

Не изменилась экспрессия гена *LICAM*, который кодирует гликопротеин клеточной поверхности, который связывается с интегринами и другими белками внеклеточного матрикса, а также с протеогликанами. Так как для прогрессирования опухоли необходимы клеточные контакты с матриксом, то из этого следует, что экспрессия гена *LICAM* способствует образованию метастаз и является неблагоприятным прогностическим маркером (Doberstein, 2014).

Таблица 1. Сравнение уровней относительной и абсолютной экспрессии клеточной линии с нокаутом гена *IGFBP6* (MDA_IGFBP6) с контрольной клеточной линией (MDA_LUC).

	MDA_IGFBP6		MDA_LUC	
	Ct	Ratio	Ct	Δ Ct
<i>VEGFA</i>	32,20	0,15	28,87	-3,33
<i>DSP</i>	33,50	0,50	31,8	-1,7
<i>CDH11</i>	35,25	0,03	29,6	-5,65
<i>LAMA3</i>	36,00	0,12	32,37	-3,63
<i>ARHGDIB</i>	31,50	6,77	33,67	2,17
<i>MMP1</i>	25,73	723,92	35,00	9,27

Где Ct – абсолютный уровень экспрессии, Ratio – относительный уровень экспрессии, а Δ Ct – разница между уровнями экспрессии контрольной клеточной линии и линии с нокаутом гена *IGFBP6*.

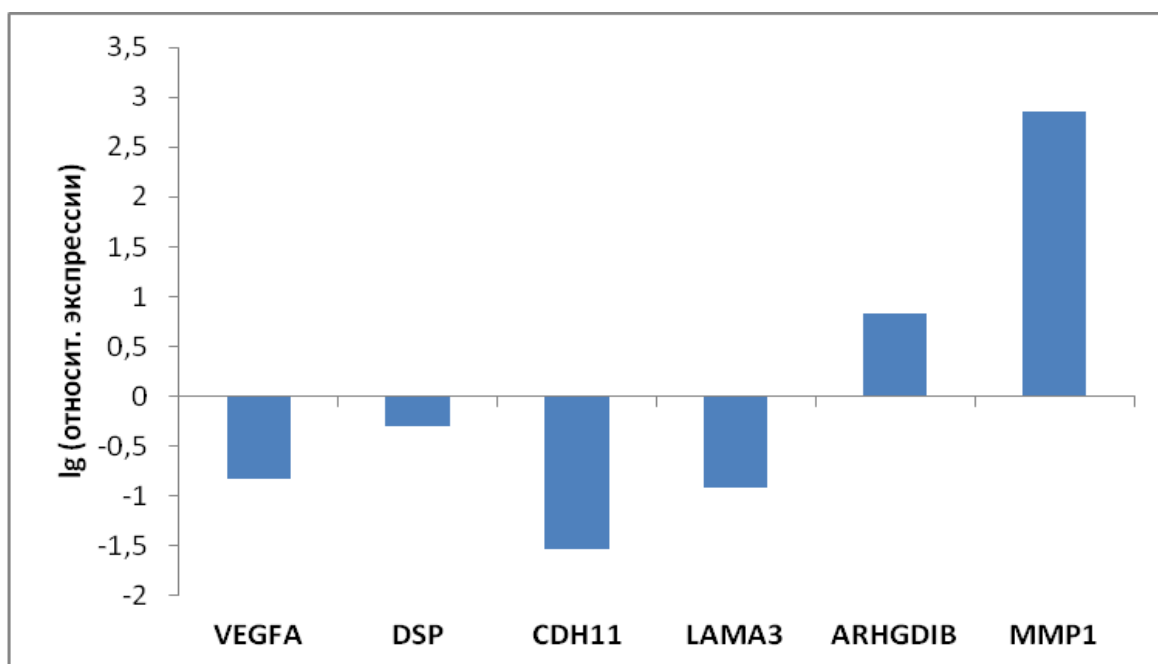


Рисунок 2. Относительная экспрессия маркеров РМЖ в клеточной линии с нокаутом гена *IGFBP6*.

Таблица 2. Сравнение уровней абсолютной и относительной экспрессии в клеточной линии с нокаутом гена *ELOVL5* (MDA_ *ELOVL5*) с контрольной клеточной линией.

	MDA_ <i>ELOVL5</i>		MDA_ LUC	
	Ct	Ratio	Ct	Δ Ct
<i>CDH2</i>	38,63	0,36	37,10	-1,53
<i>CDH11</i>	31,67	0,25	29,60	-2,07
<i>LAMA3</i>	33,00	0,65	32,37	-0,63
<i>VEGFA</i>	29,07	0,88	0,88	-0,20
<i>CD24</i>	34,20	0,20	32,10	-2,10
<i>LICAM</i>	32,87	1,02	32,87	0,00
<i>ARHGDIB</i>	32,50	2,25	33,67	1,17
<i>DSP</i>	32,30	0,73	31,80	-0,50
<i>MMP1</i>	29,47	39,85	35,00	5,53

Где Ct – абсолютный уровень экспрессии, Ratio – относительный уровень экспрессии, а Δ Ct – разница между уровнями экспрессии контрольной клеточной линии и линии с нокаутом гена *ELOVL5*.

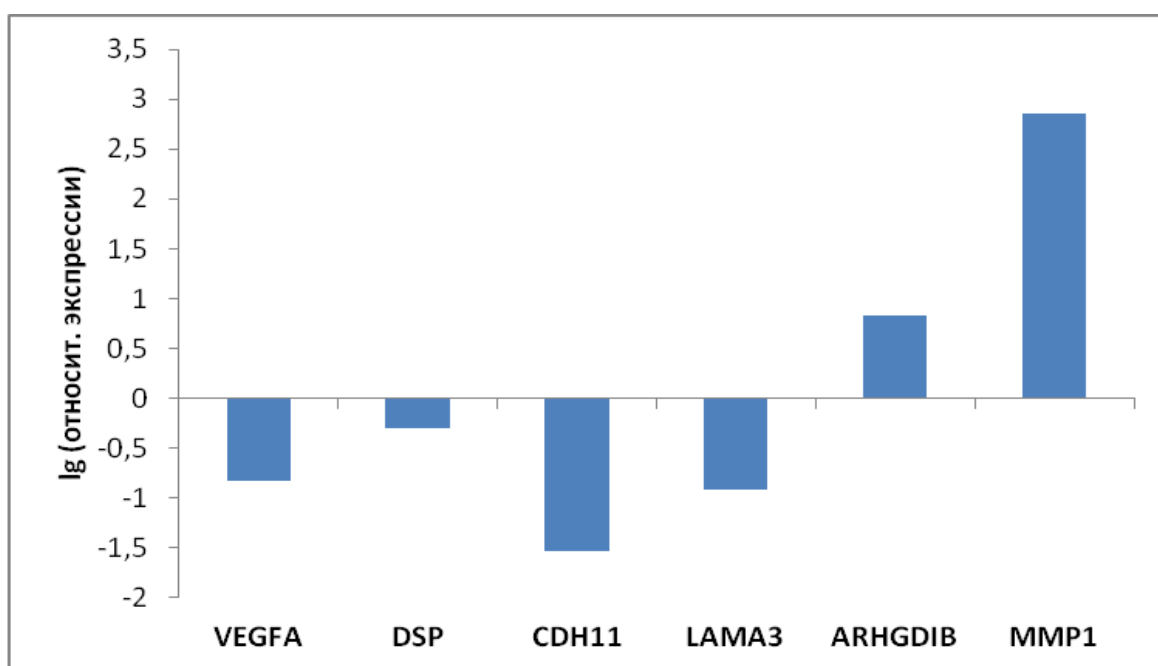


Рисунок 3. Относительная экспрессия маркеров РМЖ в клеточной линии с нокаутом гена *ELOVL5*.

Выводы

Таким образом, из полученных данных мы можем сделать следующие выводы:

1. Ген *MMP1* возможно влияет метастатическую роль гена *ELOVL5*, так как при его нокдауне экспрессия *MMP1* сильно повышена. Аналогичный вывод применим к клеточной линии с нокдауном *IGFBP6*.
2. Возможно, в контрольной клеточной линии гены *ELOVL5* и *IGFBP6* являются негативными регуляторами функции гена *ARHGDIB*, тем самым блокируя его отрицательное влияние на метастазирующие свойства раковых клеток. Таким образом, при нокдауне *ELOVL5/IGFBP6* мы наблюдаем повышение экспрессии гена *ARHGDIB* и снижение способности раковых клеток к метастазированию.
3. В клеточной линии с нокдаунами *ELOVL5/IGFBP6* возможно происходит восстановление способности раковых клеток к метастазированию в связи с большим повышением уровня экспрессии гена *MMP1*, так как он принимает участие в создании каналов для инвазии раковых клеток путем расщепления внеклеточного матрикса.

Список литературы

Никулин С.В., Райгородская М.П., Полозников А.А, и др. In vitro модель для изучения роли гена *IGFBP6* в метастазировании рака молочной железы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2017, 164(11): 646-651

Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Роль молекул клеточной адгезии Е-кадгерина в норме и при развитии злокачественной опухоли. Вестник Уральской медицинской академической науки, 2013, 4(46): 91-94

Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населения России в 2016 году. М., МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 236 с., илл.

Родионов В., Местнораспространенный и метастатический рак молочной железы. М., Lambert Academic Publishing, 2011. 304 с.

Doberstein K., Milde-Langosch K., Bretz N.P. *LICAM* is expressed in triple-negative breast cancers and is inversely correlated with androgen receptor. BMC Cancer, 2014. 15(14):958.

Freshney R.J. Culture of animal cells. G., Wiley-Liss, 2005. 691 p., ill.

Fujiwara M., Okamoto M., Hori M. Radiation-Induced RhoGDI β Cleavage Leads to Perturbation of Cell Polarity: A Possible Link to Cancer Spreading. Journal of cellular physiology, 2016, 231(11):2493-505

Maskos K., Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Molecular Biotechnology, 2003, 25(3): 241-266

Tallant C., Marrero A., Gomis-Rüth F.X. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research, 2010, 1803(1): 20-28

Jing X., Cui X., Liang H. *CD24* is a Potential Biomarker for Prognosis in Human Breast Carcinoma. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2018, 48(1):111-119

Благодарности

Я выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю Полозникову А.; Райгородской М., Захаровой Г., Никулину С. за помощь в сборе и обработке данных и Глаголеву С. за организацию лабораторной практики.