

УДК 577.21: 575.16

## Профили изменения экспрессии генов *GPX1*, *RHOA* и *NKIRAS1* как потенциальные диагностические маркеры немелкоклеточного рака легкого

Пронина И.В.<sup>1</sup>, Логинов В.И.<sup>1,2</sup>, Ходырев Д.С.<sup>3</sup>, Казубская Т.П.<sup>4</sup>, Брага Э.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр». 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий»

Федерального медико-биологического агентства России. 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 115478, Москва, Каширское ш., д. 23

*Рак лёгкого отличается высокая распространенность и смертность, связанные в значительной степени с отсутствием доступных методов ранней диагностики. Методом количественной ОТ-ПЦР показано повышение в 5 и более раз экспрессии 3 генов хромосомы 3 в большинстве образцов немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) и его гистологических подвидов: аденокарциномы легкого (АК) и плоскоклеточного рака легкого (ПРЛ). При использовании комбинации из трех генов *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1* повышение экспрессии детектируется в 85% (33/39) НМРЛ, в том числе в 78% (18/23) ПРЛ и 94% АК (15/16). Интересно, что при анализе пациентов только ранних стадий (I/II) чувствительность предложенного набора генов сохраняется и даже несколько повышается.*

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого; аденокарцинома лёгкого; плоскоклеточный рак легкого; уровень экспрессии генов; набор маркеров; гены *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1*.

**Для цитирования:** Пронина И.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Брага Э.А. Профили изменения экспрессии генов *GPX1*, *RHOA* и *NKIRAS1* как потенциальные диагностические маркеры немелкоклеточного рака легкого. Патогенез. 2018; 16(3): 116–120

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.116-120

**Для корреспонденции:** Пронина Ирина Валерьевна, e-mail: zolly\_sten@mail.ru

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках фундаментальных исследований для государственных академий на 2013-2020 годы (№ 0520-2014-0030).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 21.08.2018

## Changes in *GPX1*, *RHOA* and *NKIRAS1* gene expression profiles as potential diagnostic markers for non-small cell lung cancer

Pronina I.V.<sup>1</sup>, Loginov V.I.<sup>1,2</sup>, Khodyrev D.S.<sup>3</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>4</sup>, Braga E.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Medical Genetics Research Center, Moskvorech'ye str. 1, Moscow 115478, Russian Federation

<sup>3</sup> Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Biomedical Agency of Russia, Orekhovy Blvd. 28, Moscow 115682, Russian Federation

<sup>4</sup> N.N.Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation

*Lung cancer is distinguished by an extremely high prevalence and a high mortality rate due to its late detection and unavailability of methods for early diagnosis. Changes in gene expression were evaluated using quantitative RT-PCR. Expression of several chromosome 3 genes (specifically, *RHOA*, *GPX1*, and *NKIRAS1*) was shown to be increased 5 or more times in most samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) and its histological subtypes, lung adenocarcinoma (AC) and squamous cell lung cancer (SLC). When a combination of three genes, *RHOA*, *GPX1* and *NKIRAS1*, was used increased expression was detected in 85% (33/39) of NSCLC samples, including 78% (18/23) of SLC samples and 94% of AC (15/16) samples. Interestingly, when only samples from early-stage cancer (I/II) patients were analyzed, the sensitivity of the proposed set of genes was preserved and even somewhat increased.*

**Keywords:** non-small cell lung cancer; lung adenocarcinoma; squamous cell lung cancer; gene expression level; marker set; genes *RHOA*, *GPX1* and *NKIRAS1*.

**For citation:** Pronina I.V., Loginov V.I., Khodyrev D.S., Kazubskaya T.P., Braga E.A. [Changes in *GPX1*, *RHOA* and *NKIRAS1* gene expression profiles as potential diagnostic markers for non-small cell lung cancer]. *Pathogenesis*. 2018; 16(3): 116–120 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.116-120

**For correspondence:** Pronina Irina Valerievna, e-mail: zolly\_sten@mail.ru

**Funding:** The study was supported by the framework of basic research for state academies for 2013-2020 (No. 0520-2014-0030).

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 21.08.2018

## Введение

Рак легкого стоит на первом месте по частоте заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей [1]. К наиболее распространенному виду рака легкого (более 90%) относится немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ); выживаемость при НМРЛ в течение 5 лет после обнаружения не превышает 10–15%. Эти данные показывают актуальность выявления новых молекулярных маркеров и мишеней таргетной терапии столь социально значимого заболевания, что возможно только при изучении механизмов регуляции генов в патогенезе НМРЛ.

Целью данного исследования является изучение экспрессии генов, ранее обнаруженных как опухоль-ассоциированные при сканировании хромосомы 3 человека с помощью картирования аллельных дисбалансов и технологии NotI-микропанелей [2]. В представленной работе исследовано изменение экспрессии 5 генов хромосомы 3 (*RASSF1(A)*, *SEMA3(B)*, *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1*) в эпителиальных опухолях легкого. В результате исследования выявлены гены, с высокой частотой изменяющие уровень экспрессии, которые можно применить как маркеры для ранней диагностики НМРЛ.

## Материалы и методы исследования

Сбор образцов рака легкого и выделение суммарной РНК описано ранее [3]. Образцы РНК перед применением в исследованиях проходили обработку ДНКазой, свободной от РНКазы. Водный раствор РНК хранили при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$ .

ДНК синтезировали на матрице суммарной РНК с использованием обратной транскриптазы M-MuLV Reverse Transcriptase, «Fermentas» — Thermo Fisher Scientific, США, и вырожденных гептамеров (random heptamers) в качестве праймеров.

Содержание мРНК 6 генов определяли методом количественной ОТ-ПЦР в парных образцах от 41 больного НМРЛ, включая 16 образцов аденокарциномы лёгкого (АК) и 23 образца плоскоклеточного рака легкого (ПРЛ). В качестве контрольного гена использовали ген *B2M*. Условия ПЦР и праймеры приведены ранее [3–5]. Значимыми считали изменения уровня мРНК в 5 раз или более.

## Результаты исследования и обсуждение

Методом ОТ-ПЦР определены паттерны изменения экспрессии для 5 генов короткого плеча хромосомы 3 (*RASSF1(A)*, *SEMA3(B)*, *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1*) в 41 образце НМРЛ (табл. 1).

Как видно из табл. 1, гены *RASSF1(A)*, *SEMA3(B)* характеризуются дифференциальной экспрессией с повышенным и пониженным уровнями мРНК в образцах НМРЛ по сравнению с нормальной тканью, взятой у того же пациента. В то же время наблюдается многократное повышение уровней экспрессии *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1* в большинстве образцов НМРЛ (табл. 2). Пример количественной оценки изменений уровня экспрессии гена *RHOA* показан на рисунке.

Проведена оценка диагностического потенциала трех генов *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1* на выборке из 39 образцов НМРЛ, включающих 16 образцов АК и 23 образца ПРЛ, и охарактеризованных клинически и гистологически (табл. 2). Приведены данные по изменению уровня мРНК генов в конкретных образцах опухолей в сравнении с гистологически неизмененными тканями и клинико-гистологические характеристики образцов.

Каждый из трёх указанных генов *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1* повышает экспрессию в большинстве образцов (64–79 %) и может представлять потенциальный диагностический маркер для НМРЛ. Было рассчитано количество образцов, в которых экспрессия повышается при использовании комбинации из этих трех генов, причем как для всей выборки НМРЛ, так и для её подвидов — АК и ПРЛ. Оказалось, что повышение экспрессии данных генов выявлялось в 85% образцов НМРЛ, 78% ПРЛ, и 94% АК (табл. 3).

Таким образом, комбинацию генов *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1* можно предложить как набор потенциальных диагностических маркеров, которые позволяют выявлять НМРЛ, ПРЛ и АК с высокой чувствительностью: 85%, 78% и 94% соответственно (табл. 3). Особенно полезно применение этого набора генов для обнаружения или подтверждения АК. Интересно, что при анализе пациентов только ранних стадий чувствительность предложенного набора генов даже несколько повышается и достигает при НМРЛ — 87%, ПРЛ — 81% и в случае АК — 100%.

Таблица 1

### Сравнительный анализ изменений экспрессии 5 генов хромосомы 3 при НМРЛ

Ген	Повышение	Снижение	Нет изменений	p
<i>RASSF1(A)</i>	27% (11/41)	32% (13/41)	41% (17/41)	$>0,05$
<i>SEMA3(B)</i>	24% (10/41)	15% (6/41)	61% (25/41)	$>0,05$
<i>RHOA</i>	<b>83% (33/40)</b>	7% (3/40)	10% (4/40)	$5 \times 10^{-12}$
<i>GPX1</i>	<b>73% (30/41)</b>	10% (4/41)	17% (7/41)	$5 \times 10^{-9}$
<i>NKIRAS1</i>	<b>63% (26/41)</b>	7% (3/41)	30% (12/41)	$1 \times 10^{-7}$

Примечание. Приведены данные для парных образцов (опухоль / норма) НМРЛ (41-40). Значительные частоты изменений экспрессии для 4 генов выделены жирным шрифтом.

**Изменение количества мРНК трех генов  
и клинико-гистологические характеристики образцов НМРЛ от 39 пациентов**

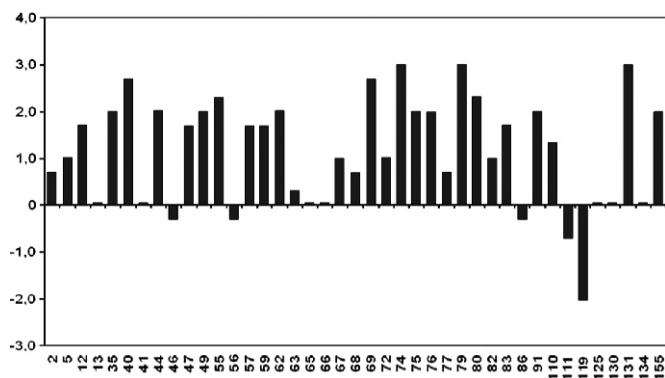
№ образца	Клиническая стадия	Степень анаплазии	Стадия по классификации TNM	<i>RHOA</i>	<i>GPX1</i>	<i>NKIRAS1</i>	
<b>Аденокарцинома лёгкого (АК, 16 образцов)</b>							
131	I	1	<i>T1N1M0</i>	1025	205	108,5	
35		2	<i>T1N0M0</i>	105	11,5	22,0	
80		2	<i>T1N0M0</i>	212	515	1,5	
75		2	<i>T2N0M0</i>	107	1040	50,5	
74		2	<i>T2N0M0</i>	1035	10225	52,0	
68	II	2	<i>T2N0M0</i>	5,5	-2,00	1,5	
79		2	<i>T2N0M0</i>	1055	10340	11,5	
83		2	<i>T2N0M0</i>	52,5	550	14,0	
69	III	2	<i>T2N2M0</i>	509,5	11,5	22,0	
110		3	<i>T2N2M0</i>	22	1,50	1,5	
49		3	<i>T3N0M0</i>	985	250	21,5	
13		3	<i>T3N2M0</i>	11,5	33,5	1,5	
67		3	<i>T3N2M0</i>	9,5	108	16,0	
2		3	<i>T3N1M0</i>	-1,05	-4,00	1,0	
5		3	<i>T3N1M1</i>	10,0	5,50	15,5	
56		2	<i>T4N1M0</i>	-1,82	110	53,0	
<b>Плоскоклеточный рак лёгкого (ПРЛ, 23 образца)</b>							
86	I	1	<i>T1N0M0</i>	-1,82	5225	-3,03	
41		2	<i>T2N0M0</i>	1,0	1,05	1,0	
63		2	<i>T2N0M0</i>	2,5	1,5	1,0	
57		2	<i>T2N0M0</i>	55,0	1115	115,0	
59		2	<i>T2N0M0</i>	50,5	53,5	1,5	
62		3	<i>T2N0M0</i>	108,5	227,0	75,0	
66	II	2	<i>T2N0M0</i>	1,5	54,5	12,5	
91		2	<i>T2N0M0</i>	105,0	536,0	535,0	
134		2	<i>T2N0M0</i>	1,5	5,5	-200,0	
130		2	<i>T2N0M0</i>	1,0	-6,99	-1000,0	
155		2	<i>T2N0M0</i>	105,0	127,0	5235,0	
46		2	<i>T2N1M0</i>	-2,00	109,5	12,5	
55		2	<i>T2N1M0</i>	205,0	51,5	23,0	
44		2	<i>T3N1M0</i>	110,5	2020	245,5	
82		3	<i>T2N1M0</i>	12,0	515	11,0	
40		3	<i>T3N0M0</i>	522,0	2205	51,5	
72		III	2	<i>T1N2M0</i>	11,5	12,0	1,5
12			2	<i>T2N2M0</i>	52,0	320	12,0
77	3		<i>T3N0M0</i>	5,5	1030	21,5	
111	3		<i>T3N1M0</i>	-5,00	1,0	1,0	
119	3		<i>T3N1M0</i>	-100,0	1,5	2,5	
47	3		<i>T3N2M0</i>	510,5	13,0	523,5	
76	3		<i>T4N2M0</i>	114,0	1110	52,0	

Таблица 3

**Частота повышения уровня мРНК генов *RHOA*, *GPX1*, *NKIRAS1*  
у пациентов с АК, ПРЛ и НМРЛ на разных клинических стадиях**

Клинические стадии пациентов	АК (16 образцов)	ПРЛ (23 образца)	НМРЛ (39 образцов)
Тотально (I, II, III, IV)	94% (15/16)	78% (18/23)	85% (33/39)
Только ранние стадии (I, II)	100% (8/8)	81% (13/16)	87% (21/24)
Только I стадия	100% (5/5)	67% (4/6)	82% (9/11)

Примечание. Повышение в 5 и более раз экспрессии хотя бы одного гена учитывалось как положительное событие и служило диагностическим признаком наличия НМРЛ.



Количественная оценка изменения содержания мРНК гена *RHOA* в опухоли по сравнению с нормой при раке легкого. Шкала ординат логарифмическая (отложен десятичный логарифм отношения количества мРНК гена *RHOA* в опухоли к количеству мРНК в гистологически нормальной ткани, полученной от того же пациента). Шкала абсцисс — парные образцы (опухоль/норма) легкого.

Можно отметить, что ген *RHOA* кодирует белок суперсемейства Ras-гомологичных малых гуанозинтрифосфатаз и участвует в регуляции функций цитоскелета. Для гена *RHOA* показано повышение экспрессии в опухолях разных локализаций, в том числе с участием авторов этой работы, причем нами также показана ассоциация повышенной экспрессии с деметилизацией гена *RHOA* [6]. Ген *NKIRAS1* — гомолог онкогена *ras*, взаимодействующий с ядерным фактором NF-κB. Повышенная экспрессия гена *NKIRAS1* отмечена нами ранее и показана её ассоциация с деметилизацией данного гена [5]. Данные по экспрессии этого гена при НМРЛ другими авторами не исследованы.

Определение диагностического потенциала для комбинации генов *RHOA*, *GPX1* и *NKIRAS1* в отношении НМРЛ и его подвидов ПРЛ и АК может найти применение в клинике или использовано для формирования комплексной и высокоэффективной диагностической системы в комбинации с другими маркерами.

#### Список литературы

1. Hirsch F.R., Scagliotti G.V., Mulshine J.L., Kwon R., Curran W.J. Jr., Wu Y.L., Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017; 389(10066): 299-311. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8
2. Dmitriev A.A., Kashuba V.I., Haraldson K., Senchenko V.N., Pavlova T.V., Kudryavtseva A.V., Anedchenko E.A., Krasnov G.S., Pronina I.V., Loginov V.I., Kondratieva T.T., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Yenamandra S.P., Ignatjev I., Ernberg I., Klein G., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*. 2012; 7(5): 502-13. DOI: 10.4161/epi.19801

3. Пронина И.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Брага Э.А. Уровень экспрессии гена *RASSF1A* в первичных эпителиальных опухолях разной локализации. *Молекулярная биология*. 2012; 46(2): 260-268. DOI: 10.1134/S0026893312010189

4. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Gerashchenko G.V., Chashchina L.I., Kazubskaya T.P., Kondratieva T.T., Lerman M.I., Angeloni D., Braga E.A., Kashuba V.I. Tumor Suppressor Function of the *SEMA3B* Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0123369. DOI: 10.1371/journal.pone.0123369

5. Логинов В.И., Пронина И.В., Бурденный А.М., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Брага Э.А., Кубатиев А.А., Кушлинский Н.Е. Роль метилирования в регуляции экспрессии функционально-значимых генов хромосомы 3: *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* в опухолях молочной железы. *Молекулярная медицина*. 2014; 6: 30-37.

6. Брага Э.А., Логинов В.И., Климов Е.А., Килосанидзе Г., Ходырев Д.С., Каганова Н.Л., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Пронина И.В., Рудько О.И., Забаровский Е.Р., Сулимова Г.Е., Киселев Л.Л. Активация транскрипции гена *RHOA* в эпителиальных опухолях может быть вызвана умножением копий гена и/или деметилизацией его промоторной области. *Молекулярная биология*. 2006; 40, 865-877. DOI: 10.1134/S002689330605013X.

#### References

1. Hirsch F.R., Scagliotti G.V., Mulshine J.L., Kwon R., Curran W.J. Jr., Wu Y.L., Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017; 389(10066): 299-311. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8
2. Dmitriev A.A., Kashuba V.I., Haraldson K., Senchenko V.N., Pavlova T.V., Kudryavtseva A.V., Anedchenko E.A., Krasnov G.S., Pronina I.V., Loginov V.I., Kondratieva T.T., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Yenamandra S.P., Ignatjev I., Ernberg I., Klein G., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*. 2012; 7(5): 502-13. DOI: 10.4161/epi.19801
3. Pronina IV, Loginov VI, Khodyrev DS, Kazubskaya TP, Braga EA. [Alterations of expression level of *RASSF1A* gene in primary epithelial tumors of various locations]. *Молекулярная биология [Molecular Biology]*. 2012; 46(2): 236-243. DOI: 10.1134/S0026893312010189 (in Russian)
4. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Gerashchenko G.V., Chashchina L.I., Kazubskaya T.P., Kondratieva T.T., Lerman M.I., Angeloni D., Braga E.A., Kashuba V.I. Tumor Suppressor Function of the *SEMA3B* Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0123369. DOI: 10.1371/journal.pone.0123369
5. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdenny A.M., Khodyrev D.S., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Kubatiev A.A., Kushlinskii N.E. [Methylation involvement in regulation of expression of functionally significant genes on chromosome 3: *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* in breast cancer]. *Молекулярная медицина [Molekulyarnaya Meditsina]*. 2014; 6: 30-37. (in Russian)
6. Braga E.A., Loginov V.I., Klimov E.A., Kilosanidze G., Khodyrev D.S., Kaganova N.L., Kazybskaia T.P., Ermilova V.D., Gar'kavtseva R.F., Pronina I.V., Rud'ko O.I., Zabarskii E.R., Sulimova G.E., Kiselev L.L. [Activation of *RHOA* gene transcription in epithelial tumors may be caused by gene amplification and/or demethylation of its promoter region]. *Молекулярная биология [Molecular Biology]*. 2006; 40(5): 778-789. DOI: 10.1134/S002689330605013X (in Russian)

---

**Сведения об авторах:**

*Пронина Ирина Валерьевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»*

*Логинов Виталий Игоревич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»*

*Ходырев Дмитрий Сергеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики Центра биомедицинских технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России*

*Казубская Татьяна Павловна — доктор медицинских наук, врач-онкогенетик, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

*Брага Элеонора Александровна — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»*