УДК 577.21: 616 – 006.6

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ С МУТАНТНЫМ И НОРМАЛЬНЫМ ГЕНОМ TP53 ПОСЛЕ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Глущенко Е.С., Белогубов П.В., Антонова А.В., Семенова М.А., Живодерников И.В., Свеколкин В.П., Викторов Д.А., Мастиленко А.В., Столбовская О.В., Саенко Ю.В.

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

Механизмы радиационно-индуцированной клеточной смерти раковых клеток опосредуются изменением экспрессии большого числа генов и являются скоординированным клеточным ответом, ключевую роль в котором играет белок p53. Для изучения роли гена TP53 в ответе раковых клеток на радиационное воздействие выполнен транскриптомный анализ дифференциально-экспрессирующихся генов в раковой клеточной линии HCT116 с нормальным и мутантным геном TP53. В ходе эксперимента раковые клетки подвергались радиационному облучению в дозе 4 Гр. Для анализа профилей экспрессии генов использовали гибридизационные ДНК-чипы высокой плотности. В результате кластерного анализа выявлено 3 группы генов с дифференциальной экспрессией. Анализ белковых взаимодействий кластеризованных генов продемонстрировал, что после радиационного облучения экспрессия связанных генов GREB1, CENPT и SREBF1 индуцируется в клетках линии HCT-116p53+/+ и подавляется в клетках линии HCT-116p53-/-. Экспрессия гена ZFAND5 может быть связана с устойчивостью клеток к радиационно-индуцированному апоптозу.

Ключевые слова: ген TP53, экспрессия генов, транскриптом, рак, радиационное излучение, кластерный анализ, анализ белковых взаимодействий

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF THE DIFFERENTIAL-EXPRESSED GENES IN CANCER CELLS WITH MUTANT AND NORMAL GENE TP53 AFTER THE RADIATION EXPOSURE

Glushchenko E.S., Belogubov P.V., Antonova A.V., Semenova M.A., Zhivodernikov I.V., Svekolkin V.P., Viktorov D.A., Mastilenko A.V., Stolbovskaya O.V., Saenko Y.V.

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

The mechanisms of radiation-induced cell death of cancer cells mediated by change in expression of a large number of genes. This process of cellular response are coordinated by numerous genes , wherein the TP53 gene play a pivotal role. In this work a whole-transcriptome analysis of differentially expressed genes in cancer cells with normal and mutant TP53 gene after exposure to radiation was performed. For analysis of gene expression profiles using DNA microarray chips. As a result, cluster analysis identified three groups of genes with differential expression. Analysis of protein interactions of clustered genes showed that after exposure to radiation GREB1, CENPT and SREBF1 gene expression induced in the cell line HCT-116r53+/+ and suppressed cell line HCT-116r53-/-. ZFAND5 gene expression may be associated with resistance of the cells to radiation-induced apoptosis.

Keywords: TP53 gene, gene expression, transcriptome, cancer, radiation, cluster analysis, analysis of protein interactions

Механизмы радиационно-индуцированной клеточной смерти раковых клеток опосредуются изменением экспрессии большого числа генов и являются скоординированным клеточным ответом, ключевую роль в котором играет белок p53. P53 способен вызвать апоптоз клеток в ответ на повреждение ДНК [5]. Генетический анализ опухолевых клеток человека продемонстрировал ключевую роль p53 в подавлении онкологических процессов. Больше половины опухолей человека из всего широкого спектра типов несут мутации гена TP53, который кодирует белок 53, а наследование мутантного гена TP53 делает его носителей предрасположенными к онкологическому синдрому Ли–Фраумени [6]. Мутация гена TP53 затрагивает целый кластер других генов, экспрессия которых зависит от белка p53. Например, запуск p53-зависимого апоптоза связан с индукцией транскрипции компонентов как внешнего, так и внутреннего механизма клеточной смерти, включая такие белки, как BAX, FAS, NOXA и PUMA [7]. Известно, что мутации гена TP53 приводят к существенным изменениям в механизме клеточного ответа на стрессовые воздействия, в частности, на радиационно-индуцированное увеличение внутриклеточной концентрации АФК. Опухоли с мутантным геном TP53 обладают высокой радиорезистентностью и способностью к метастазированию, что, как полагают, связано с их генетической нестабильностью [9]. Результатом мутации гена TP53 может стать разрушение нормальных и возникновение новых сетей экспрессирующихся генов, возникновение новых белковых взаимодействий, приводящих к появлению радиорезистентности.

Использование полно-транскриптомных методов анализа позволяет выявить группы, дифферециально-экспрессирующиеся в разных клеточных линиях в ответ на одно и тоже воздействие. Транскриптомные методы анализа приобретают решающее значение в изучении ответа нормальных и раковых клеток на внешние стрессовые воздействия, в частности, радиационное облучение. Один из способов изучения транскриптома основан на технологии гибридизационных ДНК-чипов высокой плотности. Основным достоинством технологии является возможность одновременного анализа экспрессии всей совокупности экпрессирующихся генов. Это в свою очередь позволяет изучать геном как целостную систему [3].

Целью настоящей работы стал поиск кластеров дифференциально-экспрессирующихся в раковых клетках с нормальным и мутантным геном TP53 после генов скоординированная экспрессия генов, которых повторяет динамику изменения внутриклеточной концентрации АФК после радиационного облучения в раковых клетках с мутантным и нормальным по геном TP53.

Материал и методы исследования

В экспериментах использовали клеточные линии:

1) клеточная линия рака кишечника HCT-116 p53-/- (мутантная по гену TP53);

2) клеточная линия рака кишечника HCT-116 p53+/+ (гены TP53 дикого типа).

Клетки культивировали при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Для культивирования использовали среду RPMI-1649 или DMEM, содержащую L-глутамин, 12% фетальной коровьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки облучали рентгеновским излучением, генерируемым терапевтическим акселератором Cliniac 600 при комнатной температуре в дозах 4 Гр одноразово. Мощность дозы составляла 0,03 Гр/с, при фокусном расстоянии 104 см. Высота водяного столба над клетками составляла 1 см. Клетки облучались в 24 луночных планшетах (объём лунки 2,5 мл).

Профили экспрессии генов изучались с использованием гибридизационных ДНК-микроматриц высокой плотности серии HGU133A (Human Genome U133A) фирмы Affymetrix (Санта-Клара, Калифорния, США) через 15 мин, 12 и 24 часа после радиационного воздействия. РНК выделялось с использованием набора RNeasy Mini (Qiagen, США). Качество выделенной РНК оценивалось по целостности 18S и 28S рибосомальной РНК с использованием с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Библиотека клонированных ДНК готовилась с использованием набора GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix). Мечение биотином антисмысловых библиотек клонированных РНК и очистка проводилась с использованием набора GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labeling (Affymetrix). Матрица окрашивалась стрептовидин-фикоэритрином и сканировалась на сканере GeneAtlas System (Affymetrix, Санта-Клара, Калифорния, США) [1]. Обработка данных полученных после сканирования ДНК-микроматриц, проводилась с использованием алгоритмов MAS5.

Статистическая обработка данных экспрессии генов выполнялась с использованием программного пакета SAM (http://stat.stanford.edu/~tibs/SAM/). Для кластерного анализа и построения дендрограмм использовали программы Cluster 3.0 и TreeView. Принадлежность генов к тому или иному механизму репарации ДНК определяли по базе данных KEGG. Сравнительный анализ существующих взаимодействий среди белков выполнялся при помощи программы STRING 9.0 (доступна по адресу: – http://string-db.org).

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлены данные сравнительного кластерного анализа динамики транскриптома клеточных линий HCT-116p53+/+ (с геном TP53 дикого типа) и HCT-116p53-/- (с мутированным геном TP53). Из рис. 1 можно увидеть, что существует несколько кластеров генов динамика экспрессии, которые значительно отличаются между клеточными линиями HCT-116p53+/+и HCT-116p53-/-. 1-й кластер представлен 1 геном – RAB2A и PHF14 (группа 1, рис. 1). 2-й кластер генами NME5, SURF2, RRP15, TSFM, RNASEH2B, COPS8, DPH5, ALMS1, FBXO11, MDM1, C5orf54, CCNE2, BRIP1, QRSL1 и ERVMER34-1 (группа 2, рис. 1). 3-я группа генов представлена SREBF1, LTBP4, ZFAND5, GREB1, CENTP и GNAT3 (группа 3, рис. 1). Гены RAB2A и PHF14 в клетках линии HCT-116p53+/+ имеют сниженную экспрессию по сравнению с контролем на протяжении всего эксперимента (1,12 и 24 ч), тогда как в клетках линии HCT-116p53-/- их экспрессия значительно увеличена по сравнению с контрольной группой во всех временных точках. Эти гены не связаны между собой, и их продукты не вступают во взаимодействие. Ген RAB2A кодирует белок, относящийся к семейству онкогенов RAS. Его функции заключаются в транспорте комплекса RAS из эндоплазматического ретикулума в аппарат гольджи. Ген PHF14 кодирует белок с неясными функциями. Гены 2 кластера кодируют белки, относящиеся к различным сигнальным и метаболическим путям. Но все они имеют общий профиль экспрессии. В клетках линии HCT-116p53+/+ с нормальным геном TP53 через 1 час после радиационного воздействия их экспрессия подавлена в сравнении с контрольной группой. В клетках с мутантным геном TP53 (линия HCT-116p53-/-) экспрессия этого кластера генов увеличена, т.е. находится в противофазе по отношению к экспрессии этих же генов в линии HCT-116p53+/+. Ген BRIP1 кодирует BRCA1, взаимодействующий белок С-концевой хеликазы 1.

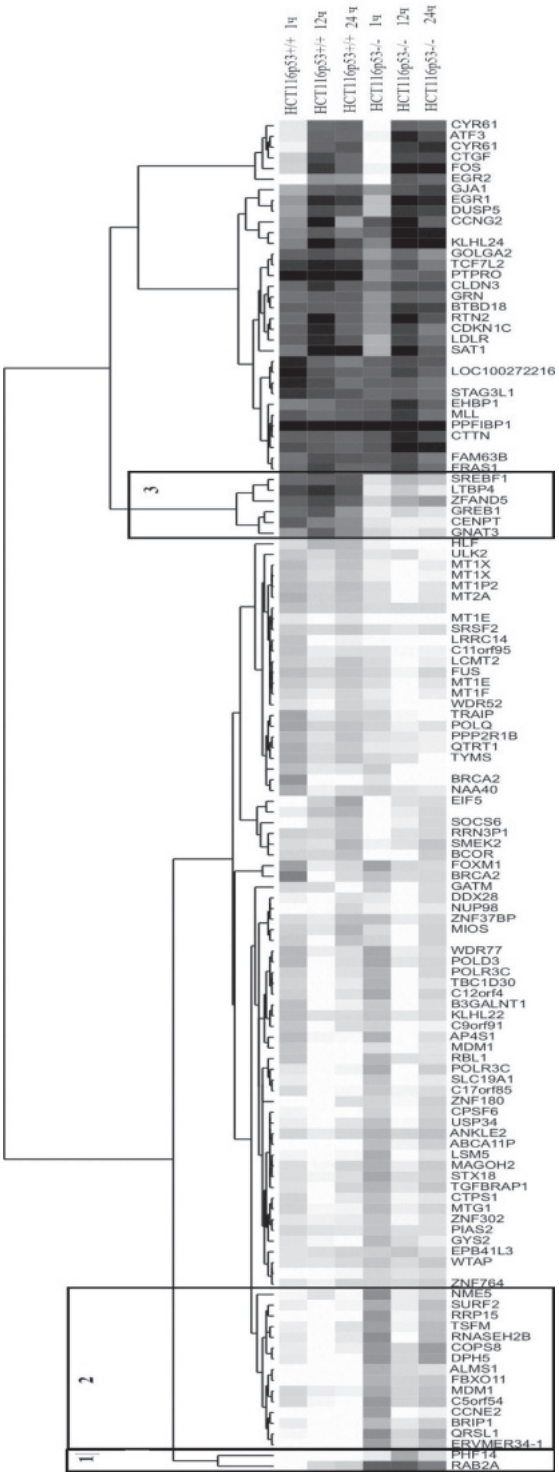

Рис. 1. Дендрограмма, отражающая кластеризацию генов, дифференциально экпрессирующихся в клетках линии HCT-116p53+ (с геном TP53 дикого типа) и HCT-116p53- (с мутантным геном TP53) после облучения гамма-излучением. (Примечание. Чем темнее цвет, тем выше экспрессия гена по сравнению с контрольной группой. Достоверность отличий по отношению к контрольной группе установлена на уровне $p < 0,05$)

Он необходим для поддержания хромосомной стабильности. Участвует в репарации двойных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации в манере, которая зависит от его связи с BRCA1 [8]. Ген NME5 кодирует белок, экспрессирующийся в неметастатических клетках. Наиболее важным, с нашей точки зрения, является набор генов CCNE2, RNASEH2B, COPS8 и BRIP1. Продукты этих генов ингибируют активность белка p53. В клетках с геном TP53 дикого типа экспрессия этих генов подавлена в течении 1 часа после радиационного воздействия. Через 12 и 24 часа после облучения их экспрессия немного увеличена или не отличается от контрольной группы (рис. 1). В клетках линии HCT-116p53-/- экспрессия этих генов на протяжении всего эксперимента является высокой по сравнению с контрольной группой.

В состав группы генов, объединенных в 3-й кластер, входят следующие гены: CENPT, GREB, ZFAND5, LTBP4, SREBF1 и GNAT3. Ген CENPT кодирует центромерный белок и является компонентом CENPA-NAC (нуклеосом-связанного) комплекса, который играет центральную роль в сборке кинетохорных белков, участвующих в процессе мейоза и сегрегации хромосом. Ген GREB1 кодирует эстроген-зависимый регулятор роста рака груди. Он является первичной мишенью в регуляции эстрогеновых рецепторов. Обладает функциями регулятора при гормон-зависимом росте рака груди и рака простаты. Ген ZFAND5 кодирует «цинковый палец», тип домена – AN1. Он может ингибировать активацию NF-kappa-B через сверхэкспрессию генов RIPK1 и TRAF6 и экспрессию фактора некроза опухолей TNF, IL-1 и TLR4-индуцировнную активацию NF-kappa-B на доз-зависимый манер. Сверхэкспрессия ZFAND5 делает клетки чувствительными к TNF-индуцированному апоптозу. Продукт гена ZFAND5 может быть также вовлечен в регуляцию активации NF-kappa-B и апоптоза [4]. Ген LTBP4 кодирует латентный трансформирующий фактор роста бета-связывающего белка 4. Продукт этого гена может быть задействован в сборке, секреции и доставки TGFB1 в сайты связывания, в которых они хранятся и/или активируются. Продукт этого гена может играть решающую роль в контроле активности TGFB1 и может иметь структурную роль во внеклеточном матриксе. Ген SREBF1 кодирует стерол-регуляторный элемент связывания транскрипционного фактора 1. Активатор транскрипции, необходимый для гомеостаза липидов, регулирует транскрипцию гена рецептора ЛНП, а также жирных кислот и в меньшей степени пути синтеза холесте-

рина. Ген GNAT3-гуанин-нуклеотид связывающий белок (G-protein) играет важную роль в трансдукции горького и сладкого вкуса, а также в трансдукции вкуса однозамещенного глутамата натрия и инозинмонофосфата.

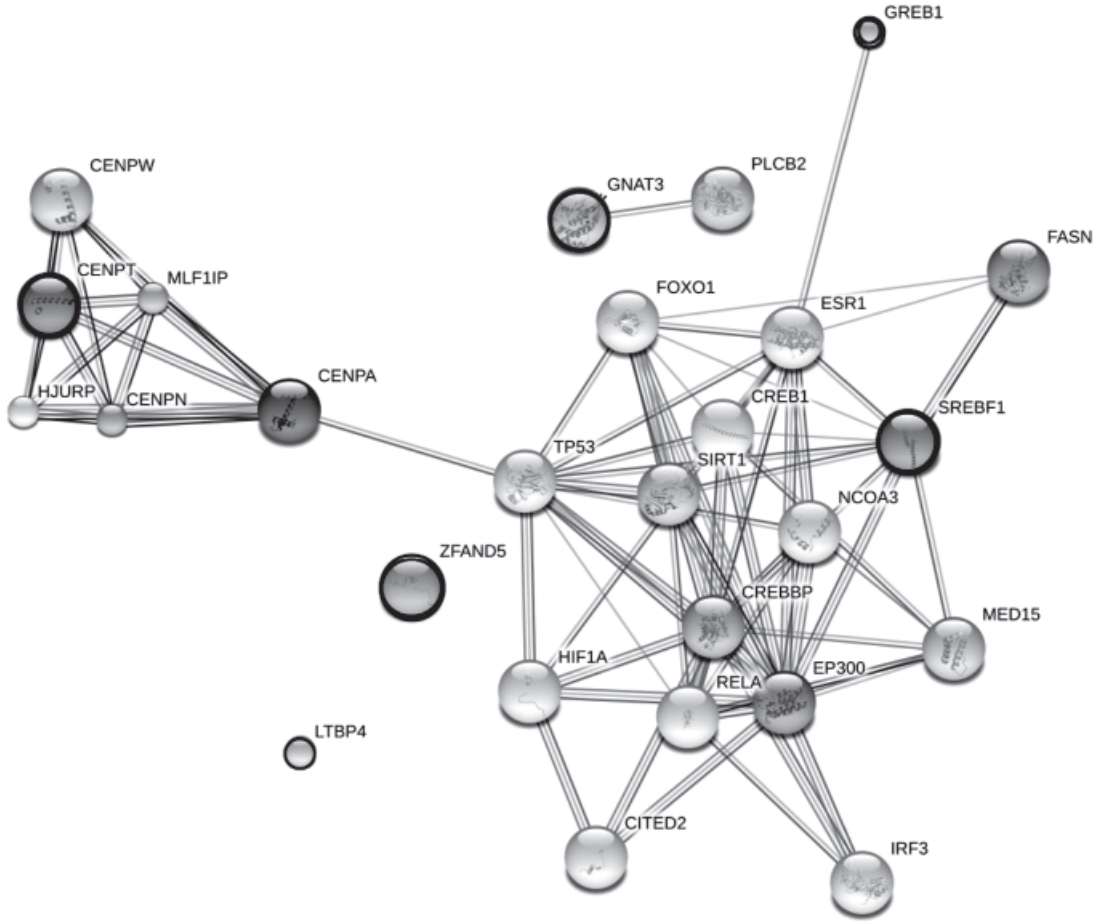

Рис. 2. Карта белковых взаимодействий генов, объединённых в 3-й кластер (рис. 1). Черной окантовкой выделены белки, гены которых были отобраны в результате кластеризации. Остальные белки отображены на карте для демонстрации взаимосвязей отобранных генов

Динамика экспрессии генов этой группы отличается больше всего среди 3-х найденных кластеров. В клетках линии HCT-116p53-/- экспрессия этих генов снижена во всех временных точках, тогда как в клетках линии HCT-116p53+/+ она повышена по сравнению с контрольной группой.

На рис. 2 представлена карта взаимодействия продуктов генов 3 кластера. Как видно из рисунка, в клетке формируется 1 белковый ансамбль, в котором участвуют продукты 3 генов, объединённых в 3-й кластер. Это гены GREB1, CENPT и SREBF1, которые связаны с активностью белка p53. Однако, исходя из функций этих генов, нельзя выявить их роль в процессах радиорезистентности. На роль генов, участвующих в развитии радиорезистентности, больше подходит ген ZFAND5. Его сверхэкспрессия делает клетки чувствительными к TNF-индуцированному апоптозу, который опосредуется каспазой 8 и 3. В клетках линии HCT-116p53+/+ гамма-излучение индуцирует апоптоз через внешний механизм, тогда как в клетках линии HCT-116p53-/- гамма-излучение не индуцирует апоптоз [2]. Сделанные ранее опыты согласуются с данными экспериментов по определению экспрессии генов с использованием ДНК-микроматриц.

В заключение, можно сделать вывод, что после радиационного облучения экспрессия связанных генов GREB1, CENPT и SREBF1 индуцируется в клетках линии HCT-116p53+/+ и подавляется в клетках линии HCT-116p53-/-. Экспрессия гена ZFAND5 пропорциональна устойчивости клеток к радиационно-индуцированному апоптозу.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследо-

вания и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» ГК № 14.512.11.0058.

Список литературы/References

1. Coller H.A. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion / H.A. Coller, C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E.S. Lander, R.N. Eisenman, T.R. Golub // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2000. – Vol. 97, № 7. – P. 3260–3265.

2. Enns L. Low-Dose Radiation Hypersensitivity Is Associated With p53-Dependent Apoptosis / L. Enns, K.T Bogen, J. Wizniak, A.D. Murtha, M. Weinfeld // *Mol. Cancer Res*. – 2004. – Vol. 2. – P. 557–566.

3. Ghandhi S. Time-series clustering of gene expression in irradiated and bystander fibroblasts: an application of FBPA clustering / S. Ghandhi, A. Sinha, M Markatou, S. Amundson // *BMC Genomics*. – 2011. – Vol *12*. – № 1. – P. 2.

4. He G. The Protein Zfand5 Binds and Stabilizes mRNAs with AU-rich Elements in Their 3'-Untranslated Regions / G. He, D. Sun, Z. Ou, A. Ding // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 3. – P. 24967–24977.

5. Junttila M.R. Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours / M.R. Junttila, A.N. Karnezis, D. Garcia, F. Madriles, R.M. Kortlever, F. Rostker, D.M. Pham, Y. Seo, G.I Evan, C.P Martins // Nature. – 2 010. – Vol. 468. – P. 567–71.

6. Olivier M. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use / M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. a001008.

7. Riley T. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – Vol. 9. – № 5. – P. 402–412.

8. Tu Z. Oncogenic Ras Regulates BRIP1 Expression to Induce Dissociation of BRCA1 from Chromatin, Inhibit DNA Repair, and Promote Senescence / Z. Tu, K. Aird, B.G. Bitler, J. Nicodemus, N. Beeharry, B. Xia, T. Yen, R. Zhang // *Developmental cell*. – 2011. – Vol. 21. – № 6. – P. 1077–1091.

9. Yang J.Y. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses/ J.Y. Yang, H.E. Hamrick, P.J. Duerksen-Hughes // Carcinogenesis. – 2003. – Vol. 24. – № 10. – P. 1571–1580.

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;

Слесарев С.М., д.б.н., доцент, заведующий кафедрой биологии и биоэкологии Института медицины, экологии и физической культуры, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 07.08.2013.