

Д.О. Мінченко

Експресія генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* та *TP53* у гліомах дітей

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна;
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, Україна

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA. 2015.1(65):126-129; doi 10.15574/SP.2015.65.126

Мета: дослідити у гліомах дітей особливості експресії генів, які причетні до порушення процесів проліферації у злоякісних пухлинах.

Пацієнти і методи. Дослідження проведені на тканині гліом (*glioblastoma multiforme*) чотирьох дітей віком від 5 до 8 років та умовно нормальній тканині, що прилягала до пухлини і була видалена разом з пухлиною під час операції. З тканини гліоми та умовно нормальної тканини, що слугувала контролем, виділяли РНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції визначали рівень експресії генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* та *TP53*.

Результати. Встановлено, що рівень експресії генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2* та *PLK* збільшується, а генів *RB1*, *RBL1* та *TP53* — знижується у тканині дитячих гліом порівняно з умовно нормальною тканиною. Більш виразні зміни були показані для генів *COL6A1*, *VEGF* та *IGFBP2*, що кодують синтез важливих регуляторних протеїнів міжклітинного матриксу.

Висновки. Посилення експресії пропроліферативних та пригнічення антипроліферативних генів у тканині дитячих гліом можуть бути причетні до росту цих злоякісних пухлин у дітей.

Ключові слова: гліома, діти, експресія генів, *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *TP53*.

Вступ

Гліоми є одними з найбільш агресивних та інвазивних видів злоякісних пухлин і зустрічаються не лише у дорослих, але й у дітей, причому виявлені певні генетичні особливості дитячих гліом [1,5]. Дослідженнями, проведеними на молекулярному та клітинному рівнях, у клітинах гліоми були виявлені зміни в ключових сигнальних шляхах, що контролюють процеси проліферації та апоптозу, зокрема шляхи, пов'язані з пухлинними супресорами *TP53* (tumor protein 53) та *RB1* (retinoblastoma 1), а також з іншими транскрипційними факторами і регуляторними протеїнами [4,8,12,13,15,16]. Відомо, що протеїн *TP53* координує перебіг різноманітних процесів у клітинах шляхом регуляції експресії генів, відповідальних за апоптоз та заупинку клітинного циклу [13]. Пухлинні супресори *RB1* та *RBL1* також беруть участь у контролі клітинного циклу, процесів проліферації та апоптозу, взаємодіють з цикліном *D1* [4].

Особлива роль у процесах малігнізації належить серин-треоніновим протеїнкіназам, зокрема протеїнкіназам родини *PLK* (POLO-like kinase), що задіяні у регуляції клітинного циклу та проліферації пухлинних клітин, найбільш важливою з яких є *PLK1* (polo-like kinase-1) [15,16]. Ця протеїнкіназа є ключовим регулятором проходження клітинного циклу і мітозу, причому дисрегуляція її експресії виявлена у різних злоякісних пухлинах [3,11]. Не менш важливу роль у посиленні процесів проліферації за злоякісного росту відіграють *VEGF* (vascular endothelial growth factor), *IGFBP2* (insulin-like growth factor binding protein 2), *E2F8* (транскрипційний фактор родини *E2F*) та *COL6A1* (субодиниця *A1* колагену типу *VI*) [2,6,7,9,10]. Нещодавно було показано, що транскрипційні фактори *E2F7* та *E2F8* (*E2F7/8*) є регуляторами ангиогенезу, посилюючи разом з *HIF* (фактор, що індукується за гіпоксії) експресію *VEGF* [2,10]. Більше того, *E2F8* посилює проліферацію клітин гепатоми, зв'язуючись із регуляторним елементом генів цикліну *D1* та *VEGFA*, регулюючи їх транскрипцію. Для *IGFBP2* була показана його надек-

спресія у гліобластомі, що негативно корелювало з виживанням пацієнтів, причому підвищена експресія *IGFBP2* спостерігалася у ділянках гліоми, що містять стовбурові клітини [9]. Слід зазначити, що пухлини дітей значно рідше мають соматичні мутації, а тому є важливим пошук нових генів-мішеней для розробки принципово нових терапевтичних підходів до їх лікування [16].

Метою даної роботи було вивчити рівень експресії генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* та *TP53* у гліомах дітей порівняно з умовно нормальною тканиною, взятою від тих самих пацієнтів під час операції, для виявлення тих генів, зміна експресії яких може бути пов'язана з ростом цих злоякісних новоутворень.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проведені на тканині гліом (*glioblastoma multiforme*) чотирьох дітей віком від 5 до 8 років та умовно нормальній тканині, що прилягала до пухлини і була видалена разом з пухлиною під час операції. Обстеження пацієнтів та отримання біологічного матеріалу було проведено лікарем Ю.Є. Новіком у Дніпропетровській обласній клінічній лікарні ім. І.І. Мечникова з дотриманням усіх біотичних вимог і передано його для досліджень до Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

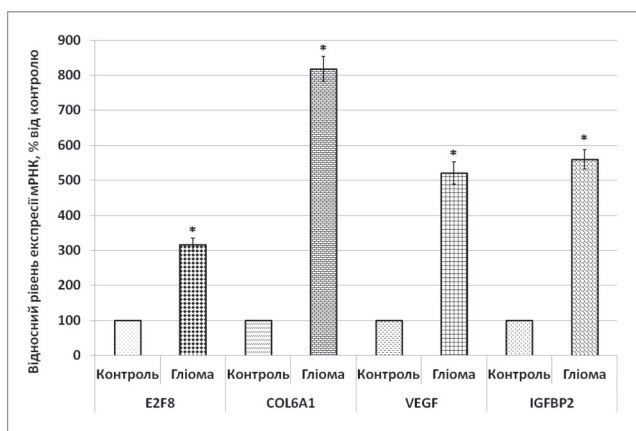
З тканини гліоми та умовно нормальної тканини, що слугувала контролем, виділяли РНК за допомогою реагенту *Trisol* (Invitrogen, США) згідно з протоколом виробника. Експресію генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* та *TP53*, а також бета-актину, як контрольного гена, досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті *The 7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), використовуючи для проведення реакції *Absolute QPCR SYBR-Green Mix* (Thermo Scientific, Великобританія) та пари праймерів, специфічних для кожного гена, що були отримані із компанії *Sigma-Aldrich* (США). Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували тотальну РНК із тканини гліом та умов-

но нормальних тканин як матрицю та набір QuantiTest Reverse Transcription (QIAGEN, Німеччина), в якому передбачено етап, що забезпечує елімінацію можливих залишків геномної ДНК.

Дослідження експресії мРНК E2F8 проводили з праймерами 5'- CCACCACAGCAAATATCGTG -3' — прямий та 5'- CTTGGCCTCAGGTAATCCA -3' — зворотний, VEGF — А - прямий 5'- CСТТGCTGCTCTACCTCCAC -3' та зворотний 5'- ATCTGCATGGTGATGTTGGA -3', COL6A1 — прямий 5'- CTGGGCGTCAAAGTCTTCTC -3' і зворотний 5'- ATTCTGAAGGAGCAGCACACT -3', IGFBP2 — прямий 5'- CСТCAAGTCGGGTATGAAGGAG -3' та зворотний 5'- САACAGGAАCTGGACCAGGT -3', PLK1 — прямий 5'- САССАAGGТТТTCGATTGCT -3' та 5'- ТАСССАAGGCCGТАCTTGTC -3' — зворотний, RB1 — прямий 5'- TGCATGGCTCTCAGATTСАС -3' і зворотний 5'- АAGGТGAGGTGCTTGТGT -3', RBL1 — прямий 5'- GAAGGATGTTCGAGGACAА -3' та зворотний 5'- TGCGGCATGCAACATATAAT -3', а TP53 — 5'- GGCCCACTTCACCGTACTAA -3' — прямий та 5'- GTGGTTTCAAGGCCAGATGT -3' — зворотний. Відносну кількість транскриптів досліджених генів нормалізували за рівнем експресії бета-актину (ACTB), для ампліфікації якого використовували наступні праймери: прямий — 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний — 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3', і результати представляли у відсотках від контролю (100%) як $M \pm m$. Аналіз результатів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми Differential expression calculator, а статистичний аналіз — як описано раніше [14].

Результати дослідження та їх обговорення

Для виявлення можливих молекулярних механізмів росту гліом у дітей були проведені дослідження з вивчення експресії низки ключових пропроліферативних генів, а також генів пухлинних супресорів, у тканині гліоми порівняно з умовно нормальною тканиною, що прилягала до пухлини і була видалена разом з нею під час операції. Як видно з рис. 1, рівень експресії гена E2F8 у тканині дитячої гліоми посилюється у понад тричі порівняно



Примітка: * $p < 0,001$ порівняно з контролем

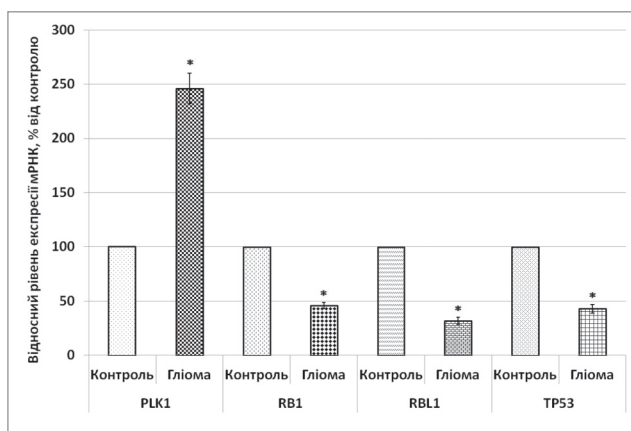
Рис. 1. Відносний рівень експресії генів E2F8, COL6A1, VEGF та IGFBP2 у тканині дитячої гліоми (гліома) та в умовно нормальній тканині (контроль), взятих під час операції від одних і тих самих пацієнтів ($n=4$), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії цих генів нормалізували за експресією бета-актину, причому рівень експресії генів E2F8, COL6A1, VEGF та IGFBP2 у контролі був прийнятим за 100%

з умовно нормальною тканиною ($p < 0,001$), але рівень експресії генів COL6A1, VEGF та IGFBP2 збільшувався більш виразно. Так, експресія гена COL6A1 посилювалася у понад 8 разів, а генів VEGF та IGFBP2 — у понад 5 разів порівняно з умовно нормальною тканиною ($p < 0,001$ для всіх цих трьох генів) (рис. 1).

Різне посилення експресії гена транскрипційного фактора E2F8, а також генів COL6A1, VEGF та IGFBP2, що кодують синтез пропроліферативних протеїнів, у тканині дитячих гліом може свідчити про їх можливий внесок у розвиток цієї патології, що узгоджується з даними інших авторів [1,5,6,9,10], оскільки білкові продукти цих генів контролюють процеси проліферації та виживання клітин, їх апоптоз. Так, транскрипційний фактор E2F8 є надзвичайно важливим у регуляції клітинного циклу і проліферації клітин, посилює ангиогенез, активуючи разом із HIF1 транскрипцію гена VEGFA, і посилено експресується у злоякісних пухлинах печінки [6]. Надекспресія гена IGFBP2 була виявлена у гліобластомі дорослих, причому підвищена експресія IGFBP2 спостерігалася у ділянках гліоми, що містять стовбурові клітини, що негативно корелювало з виживанням пацієнтів [9].

На рис. 2 представлені дані про рівень експресії генів PLK1, RB1, RBL1 та TP53 у тканині дитячої гліоми порівняно з умовно нормальною тканиною, прийнятою за контроль. Із цих даних видно, що експресія гена PLK1 різко посилюється (майже у 2,5 разу, в той час як експресія генів пухлинних супресорів RB1, RBL1 та TP53, навпаки, виразно пригнічується: гена RBL1 — втричі, а генів RB1 та TP53 — у понад двічі порівняно з умовно нормальною тканиною ($p < 0,01$ для всіх цих генів).

Ці результати переконливо свідчать про причетність дисрегуляції експресії цих генів до росту дитячих гліом, що узгоджується з даними літератури про біологічну роль цих генів як ключових регуляторів клітинного циклу, процесів проліферації та апоптозу [2,3,8,12,13,15]. Так, PLK1 є ключовим регулятором проходження клітинного циклу і мітозу, причому дисрегуляція її експресії виявлена у різних злоякісних пухлинах [3,15,16], тому вона може бути відповідальною за прогресію і дитячих гліом. Пухлинні супресори TP53,



Примітка: * $p < 0,01$ порівняно з контролем

Рис. 2. Відносний рівень експресії генів PLK1, RB1, RBL1 та TP53 у тканині дитячої гліоми (гліома) та в умовно нормальній тканині (контроль), взятих під час операції від одних і тих самих пацієнтів ($n=4$), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії цих генів нормалізували за експресією бета-актину, причому рівень експресії генів PLK1, RB1, RBL1 та TP53 у контролі був прийнятим за 100%

RB1 та RBL1 є негативними регуляторами клітинного циклу, процесів проліферації і виживання клітин, активуючи апоптоз, причому проявляють вони свій вплив через взаємодію з іншими транскрипційними факторами і регуляторними протеїнами [2,3,8,13,15]. Слід зазначити, що протеїн TP53 має багато інших функцій, він координує перебіг різноманітних процесів у клітинах шляхом регуляції експресії генів, відповідальних не лише за апоптоз та зупинку клітинного циклу [13].

Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що експресія генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* та *TP53*, які відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації та апоптозу, може бути причетною до росту гліом у дітей, і деякі із них можуть бути мішенями для розробки нових підходів до пригнічення росту цих злоякісних пухлин, що заслуговує на подальше всебічне вивчення.

Висновки

1. Встановлено, що рівень експресії генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2* та *PLK1* збільшується у тканині дитячих гліом порівняно з умовно нормальною тканиною, взятою від тих самих пацієнтів, причому більш виразні зміни виявлені для генів *COL6A1*, *VEGF* та *IGFBP2*, що кодують синтез важливих пропроліферативних регуляторних протеїнів міжклітинного матриксу.

2. Показано, що рівень експресії генів *RB1*, *RBL1* та *TP53*, що кодують синтез супресорів росту пухлин, різко знижується у тканині дитячих гліом порівняно з умовно нормальною тканиною, взятою від тих самих пацієнтів.

3. Посилення експресії пропроліферативних та пригнічення антипроліферативних генів у тканині дитячих гліом можуть бути причетні до росту цих злоякісних пухлин у дітей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anti-angiogenic treatment for high-grade gliomas: current concepts and limitations / P. De Bonis, G. Marziali, V. Vigo [et al.] // *Expert. Rev. Neurother.* — 2013. — Vol. 13, № 11. — P. 1263—1270.
2. Bakker W. J. HIF proteins connect the RB-E2F factors to angiogenesis / W. J. Bakker, B. G. Weijts, B. Westendorp, A. de Bruin // *Transcription.* — 2013. — Vol. 4, № 2. — P. 62—66.
3. Centrosomal protein 55 (Cep55) stability is negatively regulated by p53 protein through Polo-like kinase 1 (Plk1) / Y. C. Chang, C. H. Wu, T. C. Yen, P. Ouyang // *J. Biol. Chem.* — 2012. — Vol. 287, № 6. — P. 4376—4385.
4. Cyclin D1 is a selective modifier of androgen-dependent signaling and androgen receptor function / C. E. Comstock, M. A. Augello, M. J. Schiewer [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, № 10. — P. 8117—8127.
5. Diaz A. K. The genetic signatures of pediatric high-grade glioma: no longer a one-act play / A. K. Diaz, S. J. Baker // *Semin. Radiat. Oncol.* — 2014. — Vol. 24, № 4. — P. 240—247.
6. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation / Q. Deng, Q. Wang, W. Y. Zong [et al.] // *Cancer Res.* — 2010. — Vol. 70, № 2. — P. 782—791.
7. Expression microarray meta-analysis identifies genes associated with Ras/MAPK and related pathways in progression of muscle-invasive bladder transition cell carcinoma / J. A. Ewald, T. M. Downs, J. P. Cetnar, W. A. Ricke // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, № 2. — P. e55414.
8. Golubovskaya V. M. Targeting the p53 pathway / V. M. Golubovskaya, W. G. Cance // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* — 2013. — Vol. 22, № 4. — P. 747—764.
9. Hsieh D. IGFBP2 promotes glioma tumor stem cell expansion and survival / A. Hsieh, B. Stea, R. Ellsworth // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2010. — Vol. 397, № 2. — P. 367—372.
10. Identification of COL6A1 as a differentially expressed gene in human astrocytomas / A. Fujita, J. R. Sato, F. Festa [et al.] // *Genet. Mol. Res.* — 2008. — Vol. 7, № 2. — P. 371—378.
11. Kachaner D. Plk1-dependent phosphorylation of optineurin provides a negative feedback mechanism for mitotic progression / D. Kachaner, J. Filipe, E. Laplantine // *Mol. Cell.* — 2012. — Vol. 45, № 4. — P. 553—566.
12. Kinome-wide Functional Screen Identifies Role of PLK1 in Hormone-Independent, ER-Positive Breast Cancer / N. E. Bhola, V. M. Jansen, S. Bafna [et al.] // *Cancer Res.* — 2015. — Vol. 75, № 2. — P. 405—414.
13. Mills K. D. Tumor suppression: putting p53 in context / K. D. Mills // *Cell Cycle.* — 2013. — Vol. 12, № 22. — P. 3461—3462.
14. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via induction of VEGF, IL-8, COX-2 and ADAMTS-1 metalloprotease, implicating a novel role for lipid oxidation in progression and destabilization of atherosclerotic lesions / V. N. Bochkov, M. Philippova, O. Oskolkova [et al.] // *Circ. Res.* — 2006. — Vol. 99, № 8. — P. 900—908.
15. p53 Suppresses E2F1-dependent PLK1 expression upon DNA damage by forming p53-E2F1-DNA complex / Z. Zhou, J. X. Cao, S. Y. Li [et al.] // *Exp. Cell Res.* — 2013. — Vol. 319, № 20. — P. 3104—3115.
16. PLK1 phosphorylates PAX3-FOXO1, the inhibition of which triggers regression of alveolar rhabdomyosarcoma / V. Thalhammer, L. A. Lopez-Garcia, D. Herrero-Martin [et al.] // *Cancer Res.* — 2015. — Vol. 75, № 1. — P. 98—110.

Експресія генів *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* і *TP53* в гліомах дітей

Д.А. Минченко

Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина;
Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина

Цель: изучить в глиомах детей особенности экспрессии генов, которые ответственны за нарушение процессов пролиферации в злокачественных опухолях.

Пациенты и методы. Исследования проведены на ткани глиом четырех детей в возрасте от 5 до 8 лет и условно нормальной ткани, прилегающей к опухоли и удаленной вместе с ней во время операции. Из ткани глиомы и условно нормальной ткани, послужившей контролем, выделяли РНК и методом количественной полимеразной цепной реакции определяли уровень экспрессии генов *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *RB1*, *RBL1* и *TP53*.

Результаты. Установлено, что уровень экспрессии генов *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2* и *PLK1* увеличивается, а генов *RB1*, *RBL1* и *TP53* — снижается в ткани глиомы по сравнению с условно нормальной тканью. Более выраженные изменения были показаны для генов *COL6A1*, *VEGF* и *IGFBP2*, которые кодируют синтез важных регуляторных протеинов межклеточного матрикса.

Выводы. Усиление экспрессии пропролиферативных и угнетение антипролиферативных генов в ткани детских глиом могут быть причастными к росту этих злокачественных опухолей у детей.

Ключевые слова: глиома, дети, экспрессия генов, *VEGF*, *E2F8*, *COL6A1*, *IGFBP2*, *PLK1*, *TP53*.

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA. 2015.1(65):126-129; doi 10.15574/SP.2015.65.126

Expression of VEGF, E2F8, COL6A1, IGFBP2, PLK1, RB1, RBL1 and TP53 genes in pediatric glioma

D.O. Minchenko

Department of Pediatrics №1, National O.O. Bohomolets Medical University, Kyiv 01601, Ukraine;

Department of Molecular Biology, Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;

Objective: The goal of this study was to study in pediatric glioma the peculiarity of the expression of genes related to dysregulation of proliferation processes in malignant tumors.

Materials and Methods: The glioma tissue from 4 children with age from 5 to 8 years as well as corresponding non-malignant tissue counterparts were used in this study. RNA was isolated from glioma tissue and corresponding non-malignant tissue counterparts (control) and VEGF, E2F8, COL6A1, IGFBP2, PLK1, RB1, RBL1, and TP53 gene expressions were studied by quantitative polymerase chain reaction.

Results: It was shown that the expression level of VEGF, E2F8, COL6A1, IGFBP2, and PLK genes is increased, but RB1, RBL1, and TP53 genes significantly decreased as compared to corresponding non-malignant tissue counterparts. More significant changes were demonstrated for COL6A1, VEGF, and IGFBP2 genes, which encoded the important regulatory proteins of extracellular matrix.

Conclusions: The obesity affects the expression of the subset of genes related to the control of glycolysis in blood cells, but insulin resistance in obesity is associated only with changes in the expression level of ENO1 and ENO2 genes, which possibly contribute to the development of insulin resistance as well as glucose intolerance.

Key words: glioma, children, gene expression, VEGF, E2F8, COL6A1, IGFBP2, PLK1, TP53.

Сведения об авторах:

Минченко Дмитрий Александрович — к.мед.н., доц. каф. педиатрии № 1 НМУ им. А.А. Богомольца.

Адреса: г. Киев, ул. Михаила Коцюбинского, 8-а; тел. (044) 465-17-89.

Статья поступила в редакцию 22.01.2015 г.

НОВОСТИ

**Продукты с высоким содержанием витамина А
опасны для беременных женщин**

Ученые из Университета Лунда изучали процесс того, как ретиноевая кислота влияла на процесс развития кровяных клеток из стволовых клеток человека. Данная кислота входит в состав витаминов группы А.

Исследователи в лабораторных условиях подвергли клетки воздействию конкретных сигнальных молекул. Специалисты заметили, что высокие уровни ретиноевой кислоты уменьшали количество формируемых

клеток крови. Снижение уровня ретиноевой кислоты увеличивало число кровяных клеток на 300%.

О вредном воздействии ретиноевой кислоты на процесс развития клеток крови уже говорилось ранее. Однако тогда исследование проводилось на животной модели. Эксперимент с использованием человеческих стволовых клеток в подобном исследовании был проведен впервые.

Источник: med-expert.com.ua