

МУТАЦИИ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА РОСТ И ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

С. А. Ермакова^{1*}, Б. Т. Жанатаев¹, Е. С. Серик²

¹НУО «Казахстанско-Российский медицинский университет», Казахстан, Алматы

² Каспийский университет, Казахстан, Алматы

*Корреспондирующий автор

Аннотация

P53 (который кодирует белок p53) является одним из наиболее часто мутирующих генов при всех раковых заболеваниях человека. Распространенные миссенс-мутации p53 отменяют его опухоль-подавляющую функцию и приводят к развитию рака GOF.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы плоскоклеточного рака, аденокарцином легких и прилегающих здоровых тканей, взятые из послеоперационного материала у онкологических больных. Методы включали полимеразную цепную реакцию фрагментов гена p53 и HRAS, а также комплементарных ДНК (с-DNA) копий мРНК p53, p21Waf1, MDM2 и анализа мутаций с помощью эндонуклеаз EcoR1 и Pst1 по наличию сайтов рестрикции.

Результаты. Анализировали наличие мутаций после амплификации фрагментов генов p53 и HRAS, а также мРНК p53, p21Waf1 и MDM2 в раковых и прилегающих тканях в 100 образцах опухолевых и нормальных прилегающих тканях. Половина образцов плоскоклеточного рака и аденокарциномы легких не содержали продуктов экспрессии генов p53 или p21Waf1. Мутации выявлены в 100 % и 85 % образцов плоскоклеточного рака в 12 и 61 кодонах гена HRAS и в 75 % и 50 % образцов аденокарциномы легких, соответственно.

Заключение. Мутации, обнаруженные в большинстве образцов плоскоклеточного рака и аденокарциномы легких, позволяют с помощью таких тестов диагностировать заболевание, прогнозировать его тяжесть и эффективность целевой терапии.

Ключевые слова: мутации гена, аденокарцинома легких, плоскоклеточный рак, GOF – приобретение другой функции, прилегающая нормальная ткань.

Введение

TP53 (который кодирует белок p53) является одним из наиболее часто мутировавших генов при всех раковых заболеваниях человека. Распространенные миссенс-мутации в p53 отменяют его опухоль-подавляющую функцию (далее – GOF gain-of-function) и приводят к развитию рака GOF. Zhu et al. [1] показали, что мутации p53 связываются с генами-регуляторами хроматина, включая метилтрансферазы MLL1, MLL2 и ацетилтрансферазу MOZ. Анализ Атласа генома рака показывает специфическую активацию MLL1, MLL2 и MOZ в опухолях с p53 GOF, но не в опухолях дикого типа p53 или нулевым p53-null [1].

Пролиферация раковых клеток заметно снижается за счет генетического нокдауна MLL1 или фармакологического ингибирования комплекса метилтрансферазы MLL1. Недавние исследования ряда авторов [2-5] показали, что трансактивация p21 (ингибитора циклин-зависимой киназы 1A) тесно связана с рекрутированием транскрипционных кофакторов в p53 чувствительных элементах (p53ПЭ) в его промоторной области. Фермент ремоделирования хроматина человека INO80 может быть рекрутирован в p53RE промотора p21 и отрицательно регулирует p21 [2]. Интересно, что высокая экспрессия p21 наблюдалась в большинстве морфологически измененных клеток, что позволя-

ет предположить, что отрицательная регуляция p21 комплексом INO80 может быть вовлечена в поддержание процесса клеточного цикла и стабильности хромосомы. Белок-белковое взаимодействие между p53 и его отрицательным регулятором MDM2 представляет собой одно из наиболее важных и интенсивно изучаемых белок-белковых взаимодействий, участвующих в профилактике рака. Это взаимодействие основано на конформации и жестко регулируется на нескольких уровнях. Разработаны молекулы с кокристаллической структурой, которые ингибируют взаимодействие p53-MDM2 / X. Ингибирование этого взаимодействия p53 дикого типа стало важной мишенью в онкологии для восстановления противоопухолевой активности p53, который называют хранителем нашего генома [6]. Несколько классов малых молекул были идентифицированы как мощные, селективные и эффективные ингибиторы p53-MDM2 / X взаимодействий, и многие кокристаллические структуры были идентифицированы с этим белком [7]. Мы изучили мутации генов-супрессоров опухолевого роста, таких как p53, p21 WAF1 и MDM2, а также генов, участвующих в контроле деления клеток, таких как HRAS ГТФ-азы, которые контролируют один из основных способов активации гена роста клеток и могут быть использованы для прогнозирования тяжести заболевания и эффективности таргетной терапии.

Материал и методы

Объектом исследования явилось 200 (n = 5 серий x 40 образцов) образцов плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого и 200 (n = 5 серий x 40 образцов) образцов прилежающих здоровых тканей, взятых из послеоперационного материала. ДНК была выделена с использованием наборов геномной ДНК Bioline ISOLATE II.

Фрагменты экзон-интронов 5-6 и 7-9 гена p53 и участки гена HRAS, содержащие кодоны 12 и 61, амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) в присутствии праймеров, специфичных для этих участков, и отбирали с помощью программы «ПРАЙМЕР». Полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (далее – ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора реагентов AmpliSens REVERTA-L-100 согласно инструкции производителя. Для этого к 10 мкл реакци-

онной смеси, содержащей гексануклеотидные праймеры, элюент РНК, дезоксинуклеотидтрифосфаты, ингибитор рибонуклеазы и 200 ЕД обратной транскриптазы, добавляли 10 мкл экстрагированной РНК (ЕС2.7.7.49). Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Затем синтезированную первую цепь кДНК вводили в смесь для копирования (амплификации) фрагментов ДНК в ПЦР.

ПЦР проводили с использованием термоджакета Hybaid Omn-E следующим образом: один цикл при 95°C в течение 5 мин, 30 последующих циклов при 94°C в течение 20 с, при 55-56°C в течение 20 с и при 72°C в течение 40 с, завершаясь одним циклом при 72°C в течение 5 мин. Реакционная смесь (25 мкл) содержала 30 нг каждого праймера, 0,5 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 5 мкл ДНК или кДНК, 2,5 ЕД Tag-полимеразы (ЕС2.7.7.7) и 5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР. Продукты ПЦР были обнаружены путем включения бромида этидия после электрофореза в 1,5-2,0 % агарозные гели в УФ-трансиллюминаторе.

На втором этапе проводили сайт-специфический эндонуклеолиз продуктов ПЦР фрагментов ДНК и кДНК с использованием рестрикционных ферментов EcoR1 и Pst1 (EU 3.1.21.4). Рестрикцию проводили в инкубационной среде, содержащей 5 мкл ПЦР-продукта, 1,25 мкл Н-буфера из набора рестрикционного фермента, одну единицу рестрикционного фермента в 1 мкл. Общий объем пробы был доведен водой до 12,5 мкл. Образцы инкубировали при 37°C в течение 1 ч, затем охлаждали во льду и диспергировали электрофорезом в 2 % агарозном геле, окрашивали бромидом этидия и анализировали интенсивность люминисценции в ультрафиолетовом свете с помощью программного обеспечения «гель-анализ».

Данное наблюдательное исследование проводилось в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации 1964 года с поправками и требованиями локального этического комитета Казахского института онкологии и радиологии (No ЛЭК-II/2008–01-007 в Реестре этических комитетов Казахстана). Для обработки экспериментальных результатов, определения коэффициента корреляции Пирсона, расчета t-критерия Стьюдента и уровня значимости P использовался Microsoft Excel. Объяснение ме-

тогда расчета доступно в виде онлайн-ового до-
полнительного материала (таблица 1, 2).

Результаты

В аденокарциноме легкого фрагменты гена p53, содержащие экзон-интроны 5-6 и 7-9, обнаружены во всех исследованных опухолевых и прилегающих тканях (n = 5 серий x 20 образцов). P21WAF1 мРНК и p53 мРНК не вы-

являлись в 50 % опухолей и 25 % прилегающих тканей. МРНК MDM2 экспрессировалась в 75 % опухолей и только в 25 % прилегающих тканей. Критерий $t > 2$, $R_{xy} > 0,8$ соответствовал вероятности безошибочного прогноза $p > 95,5$ %. Эти различия во всех образцах, содержащих мРНК, указывали на клеточный полиморфизм как в раковых, так и в соседних тканях (таблица 1).

Таблица 1. Наличие продуктов ПЦР фрагментов гена p53 и мРНК, контролирующих пролиферацию клеток, в образцах аденокарциномы легкого (X) и прилегающих к ней тканях (Y)

Серии образцов	Экзон-интрон 5-6		мРНК, pWAF1		мРНК, MDM2		мРНК, p53		Экзон-интрон 7-9	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
1	20	20	14	19	19	9	15	19	20	20
2	20	20	11	17	17	7	11	14	20	20
3	20	20	8	12	12	4	6	12	20	20
4	20	20	10	13	11	2	8	16	20	20
5	20	20	7	14	16	3	10	14	20	20
Mav	20	20	10	15	15	5	10	15	20	20
rxyd	Нет отличий		0.845402793		0.834440867		0.808053408		Нет отличий	
td	Нет отличий		2.741434646		2.622574067		2.37577257		Нет отличий	

Источник: составлено авторами

M_{av} - средние значения $M_x = \sum x/n$ и $M_y = \sum y/n$ наличия продуктов ПЦР в группах, t -критерий > 2 и $g_{xy} > 0,8$ соответствуют вероятности безошибочного прогноза различий между сравниваемыми группами. Значения $p > 95,5$ %.

ПЦР-продукт гена p53 в экзон-интронном 5-6 и 7-9 участках встречался в образцах плоскоклеточного рака значительно реже, чем в соседних прилегающих здоровых тканях (таблица 2).

Таблица 2. Наличие продуктов ПЦР фрагментов гена p53 и мРНК генов контроля клеточной пролиферации в образцах плоскоклеточного рака легких (X) и прилегающих тканей (Y)

Серии образцов	Экзон-интронные фрагменты гена p53 5-6		мРНК, pWAF1		мРНК, MDM2		p53, мРНК		эксон-интронные фрагменты гена p53 7-9	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
1	15	19	14	7	19.7	16.4	15	9	16	20
2	8	17	11	4	17.4	15	13	8	13	19.75
3	9	15	8	5	13.5	10	8	4	8	19.2
4	11	16	10	3	14	6.6	11	5.6	13	20
5	14	19	7	1	18.7	12	10	2	10	19.8
Mav	11.4	17.2	10	4	16.66	12	11.4	5.72	12	19.75
rxyd	0.806559133		0.775671752		0.8306044		0.858641109		0.828740916	
td	2.363179084		2.128704008		2.583488549		2.901435841		2.564935856	

Источник: составлено авторами

M_{av} - средние значения $M_x = \sum x/n$ и $M_y = \sum y/n$ наличия продуктов ПЦР в группах, t -критерий > 2 и $g_{xy} > 0,8$ соответствуют

вероятности безошибочного прогноза различий между сравниваемыми группами. Значения $p > 95,5$ %.

Как видно из таблицы 2 продукты ПЦР мРНК p21WAF1 и p53 отсутствовали в 50 % плоскоклеточного рака легких и значительной части прилегающих тканей. Продукт ПЦР мРНК MDM2 был обнаружен в 16-17 из каждых 20 образцов плоскоклеточного рака и 12 из 20 образцов прилегающих тканей.

Обработка рестрикционными ферментами снижала количество образцов плоскоклеточного рака, содержащих фрагменты p53 с 5-6 и 7-9 экзонами-интронами, а также количество образцов прилегающих тканей, содержащих

эти ПЦР продукты. Обработка образцов плоскоклеточного рака EcoR1 и Pst1 рестриктазами полностью удаляла мРНК p53 и MDM2 и продукты ПЦР HRAS12 и уменьшила количество образцов, содержащих такие продукты в прилегающих здоровых тканях. Однако обработка рестриктазами не снижала количество образцов плоскоклеточного рака и прилегающих здоровых тканей, содержащих продукты ПЦР HRAS61 и мРНК p21WAF1, которое и без того было низким (таблица 3).

Таблица 3. Наличие ПЦР-продуктов фрагментов генов p53, HRAS и мРНК генов контроля пролиферации клеток в образцах аденокарциномы, плоскоклеточного рака и в прилегающих к ним тканях легких

Фрагмент гена, мРНК	АДК, %		ПТ, %		ПКР, %		ПТ, %		мутаций в образцах, после обработки рестриктазами, %	
	a	b	a	b	a	b	a	b	АДК/ПТ	ПКР/ПТ
p53 (exon-intron 5-6)	100	50	100	100	57	28.50	86	57.20	50/100*	28,50/57,20*
p53 (exon-intron 7-9)	100	100	100	100	60	40	100	100	100/100	40/100
p53 mRNA	50	25	75	75	57	0	28.50	14.30	25/75	0/14.3
HRAS codon 12	75	25	75	75	71.50	0	71.4	56.60	25/75	0/56,60
HRAS codon 61	50	50	60	60	15	15	33.30	33.30	50/60	15/33,30
p21WAF1 mRNA	50	25	75	75	50	50	20	20	25/75	50/20
MDM2 mRNA	75	75	25	25	83.50	0	60	40	75/25	0/40

Примечание:

a – % от ПЦР-продукта до рестрикции;

b – % продукта ПЦР после рестрикции;

*АДК-ПТ, ПКР-ПТ – пропорции мутаций в образцах опухолей и прилегающих тканей, обработанных ферментами.

Источник: составлено авторами

Как видно из таблицы 3 рестрикционные ферменты разрушили мРНК продукта ОТ-ПЦР p53 и p21WAF1, повысив уровень выявленных мутаций при аденокарциноме легкого до 75 %, но не разрушали продукт ОТ-ПЦР мРНК MDM2 в аденокарциноме легкого (далее – АДК) и в прилегающих здоровых тканях (далее – ПТ). Рестрикционные ферменты EcoR1 и Pst1 разрушали ПЦР-продукты мРНК p53 и MDM2 во всех образцах плоскоклеточного рака легкого и в части образцов прилегающих тканей, что указывало на появление последовательностей, распознаваемых этими рестрикционными ферментами. Мутации в мРНК HRAS12, p53 и MDM2 были обнаружены в 100 % образцов плоскоклеточного рака легкого и в 43,4 %, 85,7 % и 60 %

образцов прилегающих тканей, соответственно.

Мутации в HRAS12, в мРНК p53, и p21WAF1, были обнаружены в 75 % случаев аденокарциномы легкого и в 25 % прилегающих тканей. Мутации HRAS61 присутствовали в 50 % случаев аденокарциномы легкого и 40 % прилегающих тканей, в 85 % случаев плоскоклеточного рака легкого и 66,7 % прилегающих тканей (таблица 3). Такая положительная корреляция между мутациями мРНК HRAS12 и p53 в раковых и прилегающих тканях указывала на взаимодействие между мутантными продуктами p53 и HRAS12. Мутации HRAS12 были обнаружены в 100 % образцов плоскоклеточного рака легкого по сравнению с 43 % в соседних тканях. Последовательности, специфичные для

этих ферментов рестрикции, были обнаружены во фрагментах HRAS61 при плоскоклеточном раке, аденокарциноме легкого или в прилегающих тканях.

Обсуждение

Возможные различия в спектре мутаций при плоскоклеточном раке легкого, аденокарциноме легких и прилегающих тканей могут определять рост и метастазирование этих опухолей. Таким образом, мутации в ДНК-связывающем домене в экзон-интроне 5-6 p53 ингибируют транскрипционную функцию как в раковых, так и в соседних тканях, независимо от гистологического типа опухоли. Это нарушает регуляцию экспрессии p53-зависимых генов, таких как p21WAF1 и MDM2. Hras, Kras, Nras являются важными факторами канцерогенеза. Однако опухоли с мутациями Ras часто демонстрируют потерю соответствующего аллеля дикого типа, что позволяет предположить, что протоонкогенные формы Ras могут ингибировать канцерогенез. Делеция одного аллеля Hras резко снижает количество папиллом кожи при мутациях Hras, поэтому Hras является основной мишенью мутации в этих опухолях. Тем не менее, частота развития рака кожи очень похожа, поэтому Hras дикого типа, вероятно, действует как супрессор прогрессирования папилломы до инвазивных плоскоклеточных карцином [8]. В нашем исследовании плоскоклеточный рак легкого ассоциировался с повреждением гена p53 в экзонах 5-6 и 7-9, а аденокарцинома легкого ассоциировалась с повреждением гена p53 в экзон-интронной области 5-6. Мутаций во втором участке гена p53 в экзонах 7-9 при аденокарциноме легкого и тканях, прилегающих к плоскоклеточному раку легкого или аденокарциноме легкого, не обнаружено. Несмотря на это, подавление экспрессии генов p21WAF1 и p53 было обнаружено в 50 % случаев аденокарциномы и плоскоклеточного рака легких и в 70-80 % прилегающих тканей. Обнаруженное повреждение гена p53 и отсутствие экспрессии p53 и p21Waf1 в 50 % образцов аденокарциномы легкого и плоскоклеточного рака легкого нарушили скорость роста, дифференцировки и апоптоза клетки.

Мутации гена Ras наблюдаются более чем в 30 % всех случаев рака. Они чаще встречаются при некоторых трудно поддающихся лечению злокачественных новообразованиях,

таких как более 90 % случаев рака поджелудочной железы, а также рака легких и толстой кишки. Белки Ras (N-RAS, H-Ras, K-Ras) действуют как молекулярные переключатели. При активации они связывают ГТФ, чтобы инициировать каскад сигнальных событий, которые контролируют важные клеточные процессы, такие как пролиферация и деление. Мутации гена RAS были идентифицированы в кодонах 12, 13, 59 и 61, причем мутации наиболее распространены в кодонах 12 и 61. При НМРЛ примечательная мутация обнаруживается в первой позиции кодона 12 гена K-ras (нуклеотидная последовательность дикого типа GGT). Гуанин (G) преимущественно заменяется тиминном (T) (G-T – «трансверсия»), который является «горячей точкой» мутации гена ras. При раке легких мутации H-ras или N-ras возникают только в исключительных случаях. В целом, при аденокарциноме легкого мутации ras встречаются на 15-60 % чаще, чем при плоскоклеточном раке легкого. Мутации Ras также обнаруживаются при большинстве крупноклеточных карцином [9]. KRAS является наиболее часто мутирующим геном у людей. Несмотря на его непосредственное участие в злокачественных новообразованиях и интенсивные усилия по его изучению, прямое ингибирование KRAS фармакологическими ингибиторами по-прежнему остается сложной задачей.

РНК-индуцированный нокдаун с использованием миРНК против мутантных аллелей KRAS предлагает многообещающий инструмент для селективного терапевтического сайленсинга при KRAS мутантном раке легкого. Однако основным узким местом для клинического применения является отсутствие эффективных биосовместимых систем-носителей миРНК. Наночастицы BSA загруженные мутант-специфической миРНК, являются перспективным терапевтическим подходом к KRAS-мутантному раку. Поглощение наночастиц, клеточное распределение нуклеиновых кислот, цитотоксичность и нокдаун генов, которые могут влиять на признаки рака, неконтролируемую пролиферацию и миграцию, оценивали в мутантных клетках клеточной линии аденокарциномы легкого KRAS G12S A459 [10].

Рак легких является самым болезненным и смертельным заболеванием среди других

видов рака. Существует несколько стандартных методов лечения рака легких, таких как хирургия, иммунотерапия, лучевая терапия и химиотерапия. Например, РНК-интерференция в сочетании с традиционной терапией может заставить замолчать гены, участвующие в лекарственной устойчивости. Такие гены могут мотивировать ингибирование апоптоза, способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу и репарации ДНК.

Эти гены могут быть вовлечены во внутриклеточные сигнальные пути, такие как JAK / STAT, RAS / RAF / MEK, PI3K / AKT, NICD, В-катенин / TCF / LEF. В качестве подходящих мишеней также можно рассматривать стимулирующие рецепторы, включая IGFR, EGFR, FGFR, VEGFR, CXCR4, MET, INTEGRINS, NOTCH1 и FRIZZLED [11].

При аденокарциноме легкого основными целевыми путями являются пути EGFR, PI3K/AKT/mTOR, RAS-MAPK и NTRK/ROS1 [11-16]. Многие препараты, нацеленные на эти пути, были разработаны и показали клиническую пользу [12]. Однако, хотя таргетная терапия НМРЛ обеспечивает контроль над заболеванием, опухоли неизбежно развивают лекарственную устойчивость. Таким образом, различия в мутациях при аденокарциноме легкого и плоскоклеточном раке легкого могут определять гистологические и морфологические особенности этих опухолей. Знание этих различий может помочь разработать адекватные подходы к диагностике и лечению аденокарциномы легкого и плоскоклеточного рака легкого.

Выводы

Обнаруженное повреждение гена p53 и отсутствие экспрессии p53 и p21Waf1 в 50 % образцов аденокарциномы легкого и плоскоклеточного рака легкого нарушили скорость роста, дифференцировки и апоптоза клеток. Возможные различия в спектре мутаций при плоскоклеточном раке легкого, аденокарциноме легкого и в прилегающих тканях могут определять рост и метастазирование этих опухолей. Таким образом, мутации в ДНК-связывающем домене в экзоне-интроне 5-6 p53 угнетают транскрипционную функцию как в раковых, так и в соседних тканях, независимо от гистологического типа опухоли. Это нарушает регуляцию экспрессии p53-зависимых генов, таких как p21WAF1 и

MDM2. Такая положительная корреляция между мутациями мРНК HRAS12 и p53 в раковых и прилегающих тканях указывает на взаимодействие между мутантными продуктами p53 и HRAS12. Таким образом, различия в мутациях при аденокарциноме легкого и плоскоклеточном раке легкого могут определять гистологические и морфологические особенности этих опухолей. Знание этих различий может помочь разработать адекватные подходы к диагностике и лечению аденокарциномы легкого и плоскоклеточного рака легкого. Отсутствие положительного эффекта таргетной терапии, скорее всего, связано с мутациями p53 в экзон-интронном участке 5-6 и HRAS12. Необходимо понять механизмы резистентности и разработать комбинированную терапию для улучшения результатов лечения. Достижения в области таргетной терапии за последнее десятилетие останавливают прогрессирование рака легких, одновременно улучшая выживаемость и качество жизни пациентов.

Мы обнаружили следующие особенности.

1) Фрагменты гена p53, состоящие из 5-6 и 7-9 экзонов-интронов были повреждены при плоскоклеточном раке легкого, а при аденокарциноме легкого повреждался только фрагмент, состоящий из 5-6 экзонов-интронов. Мутации гена p53 в 5-6 экзон-интронном фрагменте были обнаружены в 70 % образцов плоскоклеточного рака легкого и 50 % образцов аденокарциномы легкого, в 60 % образцов плоскоклеточного рака легкого выявили мутации также в 7-9 – экзон-интронном фрагменте.

2) Функционирование гена p53 было нарушено усеченными и мутантными мРНК, в 100% образцов плоскоклеточного рака легких и 85 % образцов прилегающих тканей, в 75 % аденокарцином легкого и в 25 % образцов прилегающих тканей.

3) Ферменты рестрикции EcoR1 и Pst1 разрушали мРНК продукта ОТ-ПЦР p53 и p21Waf1 и повысили уровень выявленных мутаций при аденокарциноме легкого до 75 %.

4) Обнаруженное повреждение гена p53 и отсутствие экспрессии p53 и p21Waf1 в 50 % образцов аденокарциномы легкого и плоскоклеточного рака легкого нарушили скорость роста, дифференцировки и апоптоза клеток.

5) Деструкция продуктов ПЦР мРНК p53 и МДМ2 рестрикционными ферментами EcoR1 и Pst1 во всех плоскоклеточных карциномах легких и части прилегающих тканей указывала на наличие последовательностей, распознаваемых этими рестрикционными ферментами. Рестрикционные ферменты не разрушали продукт ОТ-ПЦР МДМ2 при аденокарциноме легкого и в прилегающих к ней тканях.

6) Мутации в мРНК HRAS12, p53 и МДМ2 были обнаружены в 100 % образцов плоскоклеточного рака легких и в 43,4 %, 85,7 % и 60 % образцов прилегающих тканей, соответственно.

7) Мутации в HRAS12, мРНК p53 и p21WAF1 были обнаружены в 75 % образцов аденокарциномы легких и в 25 % образцов прилегающих тканей.

8) Мутации в HRAS61 присутствовали в 50 % образцов аденокарцином легкого, 40 % прилегающих тканей, 85 % образцов плоскоклеточного рака легкого и 66,7 % прилегающих тканей.

Список источников

1. Zhu J., Sammons M. A., Donahue G., Dou Z., Vedadi M., Getlik M., Barsyte-Lovejoy D., Alwar R., Katona B. W., Shilatifard A., Huang J., Hua X., Arrowsmith C. H., Berger S. L. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth // *Nature*. – 2015. – Vol. 525(7568). – P. 206-211. – DOI: 10.15252/embj.201899599.
2. Ding J., Yu C., Sui Y., Wang L., Yang Y., Wang F., Yao H., Xing F., Liu H., Li Y., Shah J. A., Cai Y., Jin J. The chromatin remodeling protein INO80 contributes to the removal of H2A.Z at the p53-binding site of the p21 gene in response to doxorubicin // *The FEBS Journal*. – 2018. – Vol. 285. – P. 3270-3285. – DOI: 10.1111/febs.14615.
3. Sui Y., Wu T., Li F., Wang F., Cai Y., Jin J. YY1 / BCCIP Coordinately Regulates P53-Responsive Element (p53RE)-Mediated Transactivation of p21 Waf1 / Cip1 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20(9). – P. 2095. – DOI: 10.3390/ijms20092095.
4. Meliala ITS., Hosea R., Kasim V., Wu S. The biological implications of Yin Yang 1 in the hallmarks of cancer // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10(9). – P. 4183-4200. – DOI: 10.7150/thno.43481.
5. Cao L., Ding J., Dong L., Zhao J., Su J., Wang L., Sui Y., Zhao T., Wang F., Jin J. Negative Regulation of p21Waf1/Cip1 by Human INO80 Chromatin Remodeling Complex Is Implicated in Cell Cycle Phase G2/M Arrest and Abnormal Chromosome Stability // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10(9). – Article no. 0137411. – DOI: 10.1371/journal.pone.0137411.
6. Khoury K., Domling A. P53 Mdm2 Inhibitors // *Current Pharmaceutical Design*. – 2012. – Vol. 18(30). – P. 4668-4678. – DOI: 10.2174/138161212802651580/.
7. Estrada-Ortiz N., Neochoritis C. G., Domling A. How to Design a Successful p53-MDM2/X Interaction Inhibitor: A Thorough Overview Based on Crystal Structures // *ChemMedChem*. – 2016. – Vol. 11(8). – P. 757-772. – DOI: 10.1002/cmdc.201500487.
8. To M. D., Rosario R. D., Westcott P. M., Banta K. L., Balmain A. Interactions between wild-type and mutant Ras genes in lung and skin carcinogenesis // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32(34). – P. 4028-4033. – DOI: 10.1038/onc.2012.404.
9. Asfar S. Conquering RAS, 1st ed. Academic Press. – 2016. – 297 p.
10. Mehta A., Dalle Vedove E., Isert L., Merkel O. M. Targeting KRAS Mutant Lung Cancer Cells with siRNA-Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles // *Pharmaceutical Research*. – 2019. – Vol. 36(9). – P. 133. – DOI: 10.1007/s11095-019-2665-9.
11. Naghizadeh S., Mohammadi A., Baradaran B., Mansoori B. Overcoming multiple drug resistance in lung cancer using siRNA targeted therapy // *Gene*. – 2019. – Vol. 714. – Article no. 143972. – DOI: 10.1016/j.gene.2019.143972.
12. Singh S. S., Dahal A., Shrestha L., Jois S. D. Genotype driven therapy for non-small cell lung cancer: resistance, pan inhibitors and immunotherapy // *Current Medical Chemistry*. – 2020. – Vol. 27. – P. 5274. – DOI: 10.2174/0929867326666190222183219.
13. Hay N., Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR // *Genes & Development*. – 2004. – Vol. 18. – P. 1926-1945. – DOI: 10.1101/gad.1212704.
14. Beevers C. S., Li F., Liu L., Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells // *International Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 119. – P. 757-764. – DOI: 10.1002/ijc.21932.

15. Liu X., Zhang X., Meng J., Zhang H., Zhao Y., Li C., Sun Y., Mei Q., Zhang F., Zhang T. ING5 knockdown enhances migration and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via EGFR/PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 54265-54276. – DOI: 10.18632/oncotarget.17346.
16. Kawano O., Sasaki H., Endo K., Suzuki E., Haneda H., Yukiue H., Kobayashi Y., Yano M., Fujii Y. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients // *Lung Cancer*. – 2006. – Vol. 54. – P. 209-215. – DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.07.006.

References

1. Zhu, J., Sammons, M. A., Donahue, G., Dou, Z., Vedadi, M., Getlik, M., Barsyte-Lovejoy, D., Al-war, R., Katona, B. W., Shilatifard, A., Huang, J., Hua, X., Arrowsmith, C. H. and Berger, S. L. (2015). Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*, 525(7568), 206-211, DOI: 10.15252/embj.201899599.
2. Ding, J., Yu, C., Sui, Y., Wang, L., Yang, Y., Wang, F., Yao, H., Xing, F., Liu, H., Li, Y., Shah, J. A., Cai, Y. and Jin, J. (2018). The chromatin remodeling protein INO80 contributes to the removal of H2A.Z at the p53-binding site of the p21 gene in response to doxorubicin. *The FEBS Journal*, 285, 3270-3285, DOI: 10.1111/febs.14615.
3. Sui, Y., Wu, T., Li, F., Wang, F., Cai, Y. and Jin, J. (2019). YY1 / BCCIP Coordinately Regulates P53-Responsive Element (p53RE)-Mediated Transactivation of p21 Waf1 / Cip1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2095, DOI: 10.3390/ijms20092095.
4. Meliala, ITS., Hosea, R., Kasim, V. and Wu, S. (2020). The biological implications of Yin Yang 1 in the hallmarks of cancer. *Theranostics*, 10(9), 4183-4200, DOI: 10.7150/thno.43481.
5. Cao, L., Ding, J., Dong, L., Zhao, J., Su, J., Wang, L., Sui, Y., Zhao, T., Wang, F. and Jin, J. (2015). Negative Regulation of p21Waf1/Cip1 by Human INO80 Chromatin Remodeling Complex Is Implicated in Cell Cycle Phase G2/M Arrest and Abnormal Chromosome Stability. *PLoS ONE*, 10(9), 0137411, DOI: 10.1371/journal.pone.0137411.
6. Khoury, K. and Domling, A. P53 Mdm2 Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18(30), 4668-4678, DOI: 10.2174/138161212802651580/.

7. Estrada-Ortiz, N., Neochoritis, C. G. and Domling, A. (2016). How to Design a Successful p53-MDM2/X Interaction Inhibitor: A Thorough Overview Based on Crystal Structures. *ChemMedChem*, 11(8), 757-772, DOI: 10.1002/cmdc.201500487.
8. To, M. D., Rosario, R. D., Westcott, P. M., Banta, K. L. and Balmain, A. (2013). Interactions between wild-type and mutant Ras genes in lung and skin carcinogenesis. *Oncogene*, 32(34), 4028-4033, DOI: 10.1038/onc.2012.404.
9. Asfar, S. (2016). *Conquering RAS*, 1st ed. Academic Press, 297 p.
10. Mehta, A., Dalle Vedove, E., Isert, L. and Merkel, O. M. (2019). Targeting KRAS Mutant Lung Cancer Cells with siRNA-Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 36(9), 133, DOI: 10.1007/s11095-019-2665-9.
11. Naghizadeh, S., Mohammadi, A., Baradaran, B. and Mansoori, B. (2019). Overcoming multiple drug resistance in lung cancer using siRNA targeted therapy. *Gene*, 714, 143972, DOI: 10.1016/j.gene.2019.143972.
12. Singh, S. S., Dahal, A., Shrestha, L. and Jois, S. D. (2020). Genotype driven therapy for non-small cell lung cancer: resistance, pan inhibitors and immunotherapy. *Current Medical Chemistry*, 27, 5274, DOI: 10.2174/0929867326666190222183219.
13. Hay, N. and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18, 1926-1945, DOI: 10.1101/gad.1212704.
14. Beevers, C. S., Li, F., Liu, L. and Huang, S. (2006). Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *International Journal of Cancer*, 119, 757-764, DOI: 10.1002/ijc.21932.
15. Liu, X., Zhang, X., Meng, J., Zhang, H., Zhao, Y., Li, C., Sun, Y., Mei, Q., Zhang, F. and Zhang, T. (2017). ING5 knockdown enhances migration and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via EGFR/PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways. *Oncotarget*, 8, 54265-54276, DOI: 10.18632/oncotarget.17346.
16. Kawano, O., Sasaki, H., Endo, K., Suzuki, E., Haneda, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Yano, M. and Fujii, Y. (2006). PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer*, 54, 209-215, DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.07.006.

АДЕНОКАРЦИНОМА МЕН ӨКПЕНІҢ ЖАЛПАҚ ЖАСУШАЛЫ ҚАТЕРЛІ ІСІГІНДЕ ЖАСУШАЛАРДЫҢ ӨСУІ МЕН БӨЛІНУІНЕ ЖАУАПТЫ ГЕНДЕРДІҢ МУТАЦИЯЛАРЫ

С. А. Ермакова^{1*}, Б. Т. Жанатаев¹, Е. С. Серик²

¹ «Қазақстан-Ресей медициналық университеті» МЕМБМ, Қазақстан, Алматы

² Каспий университеті, Қазақстан, Алматы

**Корреспондент автор*

Аңдатпа

P53 (p53 ақуызын кодтайды) – адамдардың барлық рак ауруларында жиі мутацияланатын гендердің бірі. Таралған P53 миссенс-мутациялары оның ісіктерді басатын функциясын жояды және GOF қатерлі ісігінің дамуына әкеледі.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу объектісі онкологиялық науқастардан операциядан кейінгі материалдан алынған жалпақ жасушалы карцинома, өкпенің аденокарциномасы және іргелес сау тіндердің үлгілері болды. Әдістерге p53 және HRAS генінің фрагменттерінің полимеразды тізбекті реакциясы, сондай-ақ p53, p21Waf1, MDM2 mRNA-ның комплементарлы ДНҚ (с-DNA) көшірмелері және шектеу сайттарының болуы бойынша EcoR1 және Pst1 эндонуклеазалары арқылы мутация талдауы кіреді.

Нәтижелер. P53 және RAS гендік фрагменттерін, сондай-ақ ісік пен қалыпты іргелес тіндердің 100 үлгісіндегі қатерлі ісік пен іргелес тіндердегі p53, p21Waf1 және MDM2 мРНҚ-сын амплификациялаудан кейін мутациялардың болуын талдады. Жалпақ жасушалы карцинома мен өкпе аденокарциномасының үлгілерінің жартысында p53 немесе p21waf1 гендік экспрессия өнімдері жоқ. HRAS генінің 12 және 61 кодондарында өкпе аденокарциномасының үлгілерінің 100 % және 85 % мутациялары және сәйкесінше жалпақ жасушалы карцинома үлгілерінің 75 % және 50 % анықталды.

Қорытынды. Жалпақ жасушалы карцинома мен өкпе аденокарциномасының көптеген үлгілерінде кездесетін мутациялар осындай сынақтар арқылы ауруды диагностикалауға, оның ауырлығы мен мақсатты терапияның тиімділігін болжауға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: ген мутациялары, өкпе аденокарциномасы, жалпақ жасушалы ісік, GOF – басқа функцияны алу, іргелес қалыпты тін.

MUTATIONS OF GENES RESPONSIBLE FOR THE GROWTH AND DIVISION OF CELLS IN ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL LUNG CANCER

S. A. Yermekova^{1*}, B. T. Zhanataev¹, E. S. Serik²

¹Kazakh-Russian Medical University, Kazakhstan, Almaty

²Caspian University, Kazakhstan, Almaty

**Corresponding Author*

Abstract

P53 (encoding the p53 protein) is one of the most frequently mutated genes in all human cancer diseases. Common missense mutations of p53 abolish its tumor-suppressing function (gain-of-function, GOF) and lead to the development of GOF cancer.

Materials and Methods. The study focused on samples of squamous cell carcinoma, adenocarcinoma of the lungs, and adjacent healthy tissues obtained from postoperative material of cancer patients. Methods included polymerase chain reaction of p53 and HRAS gene fragments, as well as complementary DNA (с-DNA) copies of p53, p21Waf1, MDM2, and mutation analysis using EcoR1 and Pst1 endonucleases based on restriction site presence.

Results. The presence of mutations was analyzed after amplification of p53 and HRAS gene frag-

ments, as well as p53, p21Waf1, and MDM2 mRNA in cancerous and adjacent tissues in 100 samples of tumor and normal adjacent tissues. Half of the SCC and ADC lung samples did not contain expression products of p53 or p21Waf1 genes. Mutations were detected in 100 % and 85 % of SCC samples in 12 and 61 codons of the HRAS gene, and in 75 % and 50 % of ADC samples, respectively.

Conclusion. Mutations found in the majority of SCC and ADC samples allow diagnosing the disease, predicting its severity, and assessing the effectiveness of targeted therapy through such tests.

Keywords: *gene mutations, lung adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, GOF – gene function change, adjacent normal tissue.*

АВТОРЛАР ТУРАЛЫ

Ермекова Сәуле Алиханқызы – медицина ғылымының докторы, профессор, «Қазақстан-Ресей медицина университеті» МЕМБМ, Қазақстан, Алматы; e-mail: saule.yermekova@mail.ru.

Жанатаев Бауыржан Туралыұлы – магистр, аға оқытушы, «Қазақстан-Ресей медицина университеті» МЕМБМ, Алматы, Қазақстан; e-mail: Bauyrzhan_zhanataev@mail.ru.

Серик Эльмира Серікқызы – педагогикалық ғылымдар магистрі, аға оқытушы, Каспий Университеті, Қазақстан, Алматы; e-mail: serikelmira@mail.ru.

ОБ АВТОРАХ

Ермекова Сауле Алихановна – доктор медицинских наук, профессор, НУО «Казахстанско-Российский медицинский университет», Казахстан, Алматы; e-mail: saule.yermekova@mail.ru.

Жанатаев Бауыржан Туралыұлы – магистр, старший преподаватель, НУО «Казахстанско-Российский медицинский университет, Казахстан, Алматы; e-mail: Bauyrzhan_zhanataev@mail.ru.

Серик Эльмира Серікқызы – магистр педагогических наук, старший преподаватель, Каспийский университет, Казахстан, Алматы; e-mail: serikelmira@mail.ru.

ABOUT AUTHORS

Ermekova Saule Alikhanovna, Doctor of Medical Sciences, Professor, NEI «Kazakh-Russian Medical University», Kazakhstan, Almaty; e-mail: saule.yermekova@mail.ru.

Zhanataev Bauyrzhan Turalyuly, Master's degree, Senior Lecturer, Kazakhstani-Russian Medical University, Kazakhstan, Almaty; e-mail: Bauyrzhan_zhanataev@mail.ru.

Serik ElmirA Serikkazy – Master of Pedagogical Sciences, Senior Lecturer, Caspian University, Kazakhstan, Almaty; e-mail: serikelmira@mail.ru.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Вклад авторов. Все авторы внесли равноценный вклад в разработку концепции, выполнение, обработку результатов и написание статьи.

Авторами заявлено, что данный материал ранее не публиковался и не находится на рассмотрении в других издательствах.

Финансирование. Отсутствует.

Статья поступила: 26.10.2023.

Принята к публикации: 10.12.2023.