

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЕКСОКИНАЗ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ

© 2015 г. Г.С. Краснов, А.А. Дмитриев, А.Ф. Садритдинова, М.С. Федорова, А.В. Снежкина, Н.В. Мельникова, А.В. Потеряхина, К.М. Ньюшко*, М.М. Беляков*, А.Д. Каприн*, А.Р. Зарецкий**, А.В. Кудрявцева

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

*Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена МЗ РФ, 125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

**Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10

E-mail: rhizatoeba@mail.ru

Поступила в редакцию 08.09.15 г.

Одной из универсальных особенностей злокачественных новообразований является нарушение энергетического обмена, главным образом, активация гликолиза, которая происходит уже на ранних стадиях развития рака, в том числе вследствие увеличения экспрессии гексокиназ, преимущественно НК1 и НК2. При колоректальном раке, занимающем третье место в структуре заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний в мире, традиционно выделяют повышение экспрессии НК2, которое рассматривают в качестве маркера неблагоприятного прогноза. С использованием разработанного авторами программного приложения CrossHub проведен анализ данных RNA-Seq проекта The Cancer Genome Atlas (крупнейшего ресурса в области молекулярной онкологии, собранного геномные, транскриптомные и метиломные данные для тысяч образцов более чем 20 видов рака), который, напротив, показал преимущественно снижение уровня мРНК гена НК2 и незначительные изменения для гена НК1. Данные транскриптомного анализа для колоректального рака (283 образца опухоли и 41 образец условно нормальной ткани) согласовались с результатами дальнейшей экспериментальной оценки уровня экспрессии генов гексокиназ методом количественной полимеразной цепной реакции. Повышение уровня мРНК генов НК1 и НК2 выявлено лишь в небольшой доле образцов: 12% для НК1 и 30% для НК2. При этом обнаружено снижение уровня мРНК гена НК2 в 50% случаев. Корреляционный анализ показал согласованность в изменениях экспрессии генов НК1 и НК2 (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r_s = 0,43$, $p < 0,01$), что может объясняться общими механизмами дерегуляции этих генов в колоректальных опухолях. Уровень экспрессии гена НК3 существенно повышался в 60% образцов, и, по-видимому, именно гексокиназа 3 вносит значительный вклад в активацию гликолиза при колоректальном раке.

Ключевые слова: транскриптомный анализ, дифференциальная экспрессия генов, гексокиназа, энергетический метаболизм, гликолиз, эффект Варбурга, The Cancer Genome Atlas Project, экспрессия генов.

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее частых онкологических заболеваний [1]. Несмотря на то, что на гистологическом уровне КРР относительно гомогенный и представлен аденокарциномой, каждый случай опухоли имеет уникальный молекулярный профиль вследствие наличия или отсутствия различных

генетических и эпигенетических изменений [2–4]. Колоректальный рак является одним из наиболее изучаемых видов опухолей: для КРР характерна высокая частота встречаемости, длительное течение и доступность опухолевого материала наряду с образцами доброкачественных новообразований, которые способны развиваться в злокачественные. К настоящему моменту выявлен ряд молекулярных маркеров, которые рутинно используются при диагностике, лечении, а также являются факторами прогноза [5,6].

Сокращения: КРР – колоректальный рак, ПЦР-РВ – количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, TCGA – The Cancer Genome Atlas Project.

По мере накопления данных о молекулярно-генетических характеристиках КРР стало очевидно, что существует несколько основных подтипов, различающихся по механизмам развития, а также особенностям течения и ответу на различные препараты [7–9]. Однако это разделение достаточно условное, и между группами зачастую наблюдаются пересечения. Таким образом, классификация КРР существенно затруднена в связи с большим количеством признаков, которые могут быть использованы для ее построения, а также из-за отсутствия достаточного количества данных, которые бы позволили связать те или иные признаки с различными клиническими характеристиками [5,6,10,11].

Канцерогенез – сложный многофакторный процесс, при котором происходят нарушения метаболических и сигнальных путей. Одной из универсальных характеристик злокачественных новообразований является нарушение энергетического обмена [12,13]. В большинстве случаев происходит переключение с митохондриального дыхания на гликолиз, протекающий в цитоплазме, и его активация [14]. Гликолиз – это основной путь метаболизма глюкозы, сопровождающийся синтезом АТФ, который обычно используется организмами при недостатке кислорода. Биохимик О. Варбург в 1927 г. показал, что малигнизированные клетки продолжают использовать гликолиз для получения энергии даже тогда, когда кислород присутствует в тканях в достаточном количестве [15]. Это явление получило название эффекта Варбурга. Одним из последствий является накопление лактата, который, в свою очередь, разрушает коллагеновый матрикс, соединяющий клетки между собой, что может служить одним из факторов метастазирования [16–18].

Причины и механизмы активации гликолиза в раковых клетках остаются до сих пор не полностью выявленными [14,19]. Некоторые гены, кодирующие ферменты гликолиза, демонстрируют опухоль-специфическую активацию или инактивацию [17,19,20]. Для различных видов рака нарушения экспрессии могут затрагивать различный набор генов. При КРР активация гликолиза не столь значительна, как при ряде других видов рака, однако нарушения также выявлены [21,22].

На первом этапе гликолиза происходит фосфорилирование молекулы глюкозы до глюкозо-6-фосфата при участии ферментов гексокиназ, кодируемых генами *HK1*, *HK2* и *HK3*, а также глюкокиназы *GCK* (*HK4*), экспрессирующейся преимущественно в печени и бета-клетках поджелудочной железы. Как правило, при кар-

циномах выявляется избыточная экспрессия фермента *HK2*. Гексокиназа 2 связывается с потенциал-зависимым анионным каналом (VDAC), расположенным на наружной мембране митохондрий, при этом блокируется апоптоз [13,23]. Повышение экспрессии *HK2*, а также транспортера глюкозы *GLUT1* позволяет диагностировать первичные опухоли и метастазы при помощи позитронно-эмиссионной томографии. Однако известно, что при КРР этот метод не всегда позволяет получать корректные результаты, что связано с отличительными особенностями нарушения энергетического обмена при этом виде злокачественных новообразований [24,25]. Механизмы этого нарушения до конца не выявлены.

В работе проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты первого этапа гликолиза при колоректальном раке. При помощи биоинформационных методов проанализированы данные секвенирования транскриптома, представленные в базе «The Cancer Genome Atlas» (<http://cancergenome.nih.gov/>), затем результаты подтверждены экспериментально методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на выборке пациентов, проживающих на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформационный анализ. Для предварительного скрининга экспрессии генов при колоректальном раке нами использованы данные RNA-seq проекта «The Cancer Genome Atlas» (TCGA), сочетающего результаты транскриптомных, экзомных, метиломных и других крупномасштабных исследований (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>). Всего для анализа отобрано 283 образца опухоли и 41 образец прилежащей нормальной ткани, включая 52 (26+26) парных образца.

Анализ дифференциальной экспрессии генов в парных образцах проводился с использованием пакета edgeR для среды R (использован метод аппроксимации обобщенными линейными моделями) [26] и разработанного нами программного приложения CrossHub (<https://sourceforge.net/projects/crosshub>). Анализ для двух пулов образцов также проводился в edgeR с использованием *t*-теста. Нормирование числа прочтений осуществлено методом ТММ (trimmed mean of M-values). Рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена для нормированного числа прочтений в образцах. Величины $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые.

Праймеры и зонды для ПЦР-РВ

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов в направлении 5' → 3'
<i>RPNI</i>	F: CACCCTCAACAGTGGCAAGAAG R: TGCATTTTCGCTCACTCTGTCTG Z: GCCCTCTGTCTTCAGCCTGGACTGC
<i>GAPDH</i>	F: CGGAGTCAACGGATTTGGTC R: TGGGTGGAATCATATTGGAACAT Z: CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACAT
<i>GUSB</i>	F: GATGGAAGAAGTGGTGCCTAGG R: TTAGAGTTGCTCACAAAGGTCACAG Z: CGTCCCACCTAGAATCTGCTGGCTACTACTT
<i>ACTB</i>	F: GTGCTCAGGGCTTCTTGTCTTT R: TTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGT Z: AAGGATTCTATGTGGGCGACGAGGCCCA

Поиск возможных общих транскрипционных факторов осуществлен с применением приложения CrossHub, позволяющего осуществлять анализ данных ChIP-Seq базы ENCODE, а также скрининг общих микроРНК-мишеней по пяти базам данных – TargetScan, DIANA microT, mirSVR (miRanda), PicTar, miRTarBase. В ресурсе ENCODE представлены результаты ChIP-Seq анализа для 160 основных транскрипционных факторов по шести клеточным линиям: трех линий опухолевого происхождения (HeLa-S3, HepG2), лейкемии (K562) и нормальных тканей (HUVEC, GM12878, H1-hESC). Для ряда ключевых транскрипционных факторов (Мус, CTCF и др.) представлены данные для нескольких десятков клеточных линий.

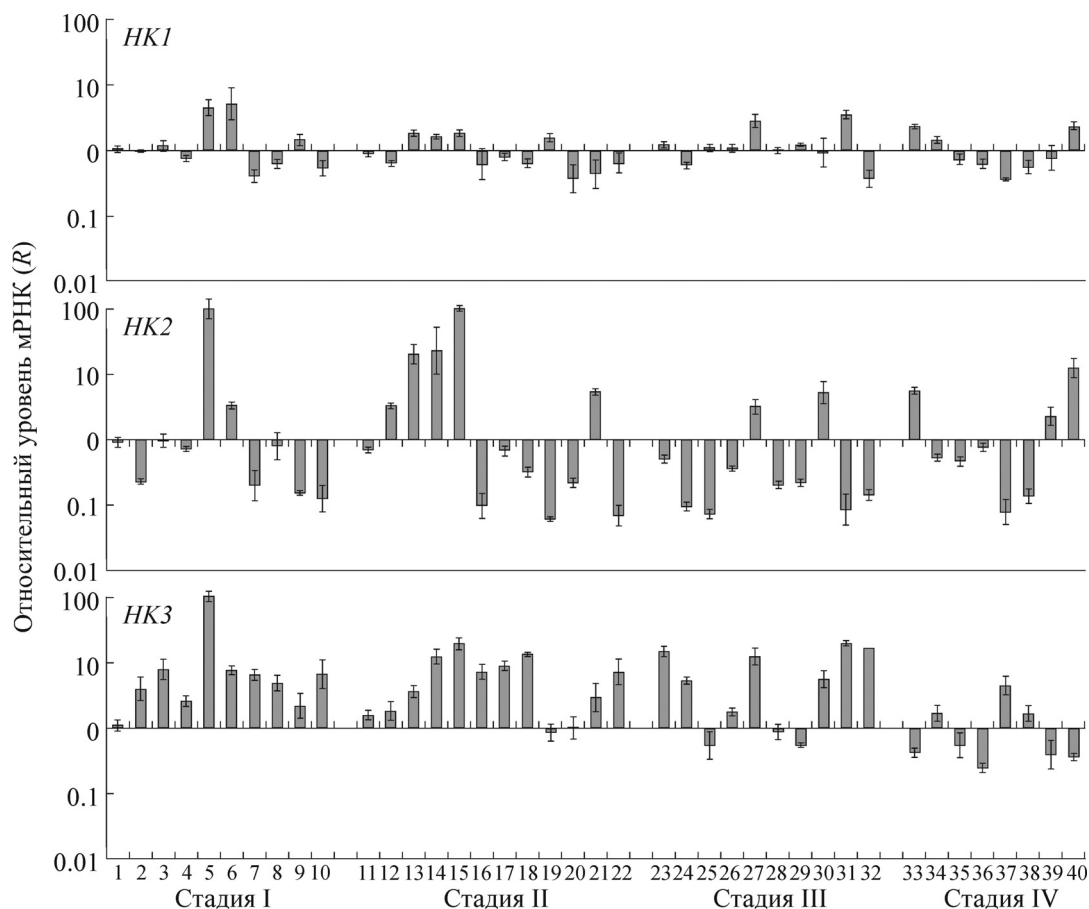
Образцы тканей. Проанализированы 40 парных образцов колоректального рака (I–IV стадий) и прилегающих к опухолям морфологически нормальных тканей. Образцы собраны под контролем патолога сразу после хирургической резекции в МНИОИ им. П.А. Герцена и охарактеризованы в отделении патологической анатомии опухолей человека в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза (UICC, версия 2002 г.). По данным гистологического исследования в каждом образце опухолевые клетки составляли не менее 70%.

Выделение РНК из тканей, получение кДНК. Замороженные в жидком азоте образцы опухолевых и нормальных тканей подвергались механической гомогенизации на микро-дисмембраторе S (Sartorius, Германия). Выделение РНК проводили с использованием специализированного набора RNeasy Mini Kit фирмы Qiagen (Германия) согласно протоколу производителя. Количество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Nanodrop, США), оценку качества проводили на Agilent

2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Параметр RIN (RNA Integrity Number – показатель качества РНК) для каждого препарата РНК составлял не менее 7. Препараты РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали при комнатной температуре. Для получения кДНК по матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием случайных гексонуклеотидов и ревертазы М-MuLV (Thermo Fisher Scientific, США).

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Амплификацию кДНК проводили в режиме реального времени с использованием наборов специфичных к целевым РНК праймеров и зондов TaqMan Assays (Thermo Fisher Scientific, США): *HK1*, Hs00175976_m1; *HK2*, Hs00606086_m1; *HK3*, Hs01092839_m1; *GCK*, Hs01564555_m1. В 96-луночный планшет вносили по 16 мкл подготовленной реакционной смеси, после чего добавляли в каждую лунку по 4 мкл (5–20 нг) матрицы (кДНК) и плотно закрывали планшет пленкой. Каждую реакцию проводили в трех технических повторностях на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием программного обеспечения RQ (Relative Quantitation software, Thermo Fisher Scientific, США). Анализ продуктов ПЦР-РВ проводили в 2% агарозном геле. Нуклеотидный состав ампликонов подтверждали секвенированием. Все наборы праймеров и зондов были специфичны в условиях ПЦР-РВ, ампликоны имели ожидаемые нуклеотидные последовательности и размер.

В качестве контрольных генов использовали *GUSB*, *GAPDH*, *ACTB* и *RPNI* [27,28]. Последовательности праймеров (F, R) и зондов (Z) для контрольных генов приведены в таблице.



Относительный уровень мРНК генов *HK1*, *HK2*, *HK3* при колоректальном раке. Данные количественной ПЦР. По оси абсцисс представлены 40 образцов колоректального рака в порядке возрастания стадии заболевания.

Для математической обработки данных ПЦР-РВ применяли ранее разработанную программу «АТГ» («Анализ Транскрипции Генов», Свидетельство № 2008612585, 2008, Роспатент, РФ). Оценку уровня мРНК проводили с использованием $\Delta\Delta Ct$ -метода и учетом эффективностей всех реакций. Достоверность наблюдаемых изменений оценивали при помощи непараметрического теста Уилкоксона. Оценку корреляций проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ дифференциальной экспрессии генов.

Анализ базы данных TCGA позволил выявить дифференциальную экспрессию гена гексокиназы II (снижения до четырех раз и повышение до двух раз; в среднем снижение более двух раз) и повышение экспрессии гексокиназы III (до пяти раз; в среднем два раза). Результаты анализа двух пулов образцов и результаты сравнения экспрессии в парных образцах согласо-

ваны между собой. Для гексокиназы I также были выявлены изменения экспрессии в различных парных образцах, однако тенденций к преобладанию тех или иных изменений отмечено не было. Абсолютный уровень экспрессии *HK2* в среднем в 2–3 раза превышал уровень экспрессии *HK1* и в 20–30 раз – уровень экспрессии *HK3*.

Корреляционный анализ позволил выявить согласованность в изменениях экспрессии *HK1* и *HK2* ($r_s = 0,41$, $p < 0,001$).

Экспериментальная проверка данных. Методом количественной ПЦР оценили относительный уровень мРНК генов *HK1*, *HK2*, *HK3* в 40 образцах колоректального рака (рисунок). Для гена *HK1* в большинстве случаев (72,5%, 29/40) наблюдалось сохранение уровня экспрессии. Повышение уровня мРНК гена *HK1* в два–пять раз отмечено в 15% (6/40) образцов, снижение в два–три раза – в 12,5% (5/40). Взаимосвязь относительного уровня мРНК гена *HK1* со стадией заболевания не выявлена.

Для гена *HK2* изменения уровня экспрессии наблюдались чаще, а степень изменений была значительней (рисунок). В 30% (12/40) образцов КРР обнаружено повышение уровня мРНК гена *HK2* от 2 до 110 раз, а в 50% (20/40) – снижение от 2 до 17 раз. Однако для гена *HK2*, как и для гена *HK1*, не выявлено корреляции относительного уровня мРНК со стадией заболевания.

Для гена *HK3* профиль экспрессии при колоректальном раке значительно отличался от профилей генов *HK1* и *HK2* (рисунок). Значительное (2–120 раз) повышение уровня мРНК гена *HK3* было обнаружено в 60% образцов (24/40, $p < 0,01$) и явилось преобладающим событием. Незначительное (два–четыре раза) снижение уровня экспрессии наблюдалось в единичных случаях при КРР стадии IV (10%, 4/40). Показана отрицательная корреляция между относительным уровнем мРНК гена *HK3* и стадией заболевания ($r_s = -0,37$, $p = 0,02$).

Экспрессия гена *GSK* в исследованных образцах КРР не выявлена.

Обнаружена значительная положительная корреляция между относительными уровнями мРНК генов *HK1* и *HK2*: $r_s = 0,43$, $p < 0,01$.

Поиск механизмов регуляции, обеспечивающий скоординированное изменение экспрессии. Для проверки предположения о том, что выявленная корреляция экспрессии генов *HK1* и *HK2* может объясняться общими механизмами их регуляции, проведен поиск возможных общих транскрипционных факторов и микроРНК. Выявлена согласованность экспрессии гексокиназ *HK1*, *HK2* и их потенциального регулятора NIF1A ($r = 0,32$, $p < 10^{-6}$). Значимых корреляций с *Мус* не выявлено.

Согласно данным по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-Seq), представленным в ресурсе ENCODE, для гексокиназ выявлено связывание с промоторными областями ряда общих транскрипционных факторов. Среди них стоит отметить транскрипционные факторы семейства Jun (JUN, JUNB, JUND). Связывание всех трех членов семейства Jun с *HK1* и *HK2* зарегистрировано с высокой вероятностью сразу в нескольких экспериментах, данные которых представлены в рамках проекта ENCODE, в то время как для *HK3* связывание JUN/JUNB/JUND ни в одном из экспериментов отмечено не было. Также для многих клеточных линий (десятки экспериментов) отмечено связывание с промоторными областями *HK1* и *HK2* про-онкогенного транскрипционного фактора *Мус*. Общих микроРНК, потенциально регулирующих гексокиназы, не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом гликолиза является фосфорилирование глюкозы по углероду в шестом положении. Эта реакция катализируется семейством ферментов гексокиназ 1–4. Данные о нарушении экспрессии генов, кодирующих гексокиназы, на уровне РНК и белка при колоректальном раке противоречивы [29], поэтому работа посвящена оценке уровня экспрессии всех членов семейства методами биоинформатики и дальнейшей экспериментальной проверке полученных данных. Большинство работ основано на общепринятом мнении, что уровень экспрессии гексокиназ, особенно *HK2*, повышается при большинстве карцином [30–33]. Однако известно, что при колоректальном раке имеет ряд ограничений применение метода позитронно-эмиссионной томографии (FDG-PET), позволяющего визуализировать первичные опухоли и метастазы именно благодаря активации гликолиза. При этом основную роль играют гексокиназы и транспортер глюкозы GLUT1. Наши исследования демонстрируют понижение уровня экспрессии двух основных гексокиназ – *HK1* и *HK2* – в большинстве образцов (на фоне повышения для *HK3*), причем выявлена корреляция в их экспрессии.

Гексокиназа 1 обладает наибольшей фосфорилирующей активностью в тех тканях, которые существенно зависят от обмена глюкозы для выполнения их функций, таких как головной мозг, в ряде клеток крови – эритроцитах, лимфоцитах, в тромбоцитах, а также в фибробластах (см. обзор [34]). Существуют различные изоформы *HK1*, которые либо локализуются в цитоплазме, либо ассоциированы с наружной мембраной митохондрий [35]. Результаты транскриптомного анализа, а также экспериментальная проверка показали отсутствие изменения или лишь незначительное понижение в большинстве образцов (снижение до трех раз). Повышение экспрессии более двух раз выявлено всего в 15% образцов, и оно не превышало пяти раз. Таким образом, в целом экспрессия гена *HK1* в большинстве образцов не изменяется, однако есть тенденция к понижению.

Большинство исследований посвящены гексокиназе 2 как наиболее перспективному маркеру и терапевтической мишени. Ген *HK2* часто высоко экспрессируется в быстро растущих опухолях, что связано с высоким уровнем метаболизма глюкозы. Показано, что промоторный участок гена *HK2* содержит функционально активный сайт посадки для мутантного p53 [36]. На клеточных линиях было показано, что мутантная форма p53 вызывает активацию экс-

прессии НК2, что свидетельствует о возможной взаимосвязи между потерей контроля над клеточным циклом у быстро растущих опухолевых клеток и уровнем гликолиза в них. Имеются работы, в которых выявлено повышение экспрессии гена НК2, однако оценка проводилась на небольшой выборке, либо для анализа использовали ткани не первичных опухолей, а метастазы [37]. Показано также, что присутствие гексокиназы 2 в опухолевой ткани, оцененное методом иммуногистохимии, может являться маркером неблагоприятного прогноза [38].

Наши результаты демонстрируют снижение в 50% до 17 раз, повышение выявлено только в 30% образцов до 110 раз. Таким образом, в подавляющем большинстве образцов происходит либо сохранение, либо понижение экспрессии. Более того, корреляционный анализ позволил выявить наличие взаимосвязи в уровнях экспрессии генов НК1 и НК2, что, по-видимому, может объясняться общими механизмами регуляции. Гены, кодирующие различные гексокиназы, произошли от общего гена-предшественника, имеют структурную высокую степень гомологии, в том числе общие сайты посадки транскрипционных факторов

Гексокиназу 3 часто исследуют совместно с остальными членами семейства для определения связи экспрессии с эффективностью диагностики методом позитронно-эмиссионной томографии. Преимущественно НК3 экспрессируется в белых кровяных клетках. Нами показано частое повышение экспрессии НК3 более чем в 100 раз. По-видимому, в основном активация первого этапа гликолиза при КРР происходит именно за счет этого фермента, а также вследствие активации транспортера глюкозы GLUT1.

Гексокиназа 4 (НК4, GSK) представляет собой глюкокиназу и является структурно и функционально уникальным членом этого семейства, играет важную регуляторную роль в метаболизме глюкозы, экспрессируется только в печени, а также в бета-клетках поджелудочной железы. Уровень метаболизма глюкозы в этих тканях, в первую очередь, зависит от активности фермента GSK [39]. Мутации в этом гене связаны с повышенным уровнем глюкозы при голодании и после приема пищи. Проведенный нами анализ дифференциальной экспрессии генов в образцах колоректального рака базы данных TCGA подтвердил, что ген GSK экспрессируется на очень низком уровне, недостаточном для сравнения нормальной и опухолевой ткани. В случае применения ПЦР-РВ амплификация при помощи коммерческого набора не происходит, что говорит о крайне низком уровне экспрессии или ее отсутствии.

Таким образом, нами показано, что гены НК1, НК2 и НК3 являются дифференциально экспрессируемыми при колоректальном раке, в то время как ген GSK практически не экспрессируется. По-видимому, при колоректальном раке активация первого этапа гликолиза происходит за счет повышения экспрессии НК3. Требуется дальнейшие исследования для сопоставления данных об изменении экспрессии на уровне РНК и белка, а также для оценки пригодности повышения экспрессии в качестве маркера неблагоприятного прогноза.

Авторы признательны Московскому научно-исследовательскому онкологическому институту им. П.А. Герцена за предоставление образцов тканей, а также Институту биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова за молекулярную характеристику образцов, проведенную с использованием приборной базы организации.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-15-01083.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Siegel, C. Desantis, and A. Jemal, CA Cancer J. Clin. **64** (2), 104 (2014).
2. M. Blanco-Calvo, A. Concha, A. Figueroa, et al., Int. J. Mol. Sci. **16** (6), 13610 (2015).
3. E. Baichoo and L. A. Boardman, Front Oncol. **4**, 158 (2014).
4. P. Minoo, Front Oncol. **3**, 266 (2013).
5. S. Shiovitz and W. M. Grady, Curr. Gastroenterol. Rep. **17** (2), 431 (2015).
6. S. Stintzing, S. Stremtzer, A. Sebio, and H. J. Lenz, Hematol. Oncol. Clin. North. Am. **29** (1), 43 (2015).
7. M. S. Pino and D. C. Chung, Gastroenterology **138** (6), 2059 (2010).
8. B. Leggett and V. Whitehall, Gastroenterology **138** (6), 2088 (2010).
9. C. R. Boland and A. Goel, Gastroenterology **138** (6), 2073 (2010).
10. B. T. Dickinson, J. Kisiel, D. A. Ahlquist, and W. M. Grady, Gut **64** (9), 1485–94 (2015).
11. G. Lech, R. Slotwinski, and I. W. Krasnodebski, Neoplasma **61** (1), 1 (2014).
12. H. Sawayama, T. Ishimoto, H. Sugihara, et al., Int. J. Oncol. **45** (4), 1345 (2014).
13. G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, V. A. Lakunina, et al., Expert Opin. Ther. Targets **17** (10), 1221 (2013).
14. G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, A. V. Snezhkina, and A. V. Kudryavtseva, Expert Opin. Ther. Targets **17** (6), 681 (2013).
15. O. Warburg, F. Wind, and E. Negelein, J. Gen. Physiol. **8** (6), 519 (1927).

16. R. Moreno-Sanchez, S. Rodriguez-Enriquez, E. Saavedra, et al., *Biofactors* **35** (2), 209 (2009).
17. R. A. Gatenby and R. J. Gillies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39** (7–8), 1358 (2007).
18. G. H. Lee, D. S. Kim, M. J. Chung, et al., *Oncol. Lett.* **2** (5), 831 (2011).
19. A. Marin-Hernandez, J. C. Gallardo-Perez, S. J. Ralph, et al., *Mini Rev. Med. Chem.* **9** (9), 1084 (2009).
20. P. Zancan, M. Sola-Penna, C. M. Furtado, and D. Da Silva, *Mol. Genet. Metab.* **100** (4), 372 (2010).
21. C. S. Yeh, J. Y. Wang, F. Y. Chung, et al., *Oncol. Rep.* **19** (1), 81 (2008).
22. J. Wang, H. Wang, A. Liu, et al., *Oncotarget* **6** (23), 19456 (2015).
23. V. Shoshan-Barmatz, D. Ben-Hail, L. Admoni, et al., *Biochim. Biophys. Acta Epub* 2014 Nov 4 (2014).
24. *Positron emission tomography (PET and PET/CT) in recurrent colorectal cancer: Executive summary of final report D06-01C, Version 1.0*, in *Institute for Quality and Efficiency in Health Care: Executive Summaries 2005* (Cologne, Germany, 2005).
25. S. Ogawa, M. Itabashi, C. Kondo, et al., *Anticancer Res.* **35** (6), 3495 (2015).
26. M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth, *Bioinformatics* **26** (1), 139 (2010).
27. G. S. Krasnov, N. Y. Oparina, A. A. Dmitriev, et al., *Mol. Biol.* **45** (2), 211 (2011).
28. M. S. Fedorova, A. V. Kudryavtseva, V. A. Lakunina, et al., *Mol. Biol.* **49** (4), 608 (2015).
29. L. H. Gregersen, A. Jacobsen, L. B. Frankel, et al., *BMC Cancer* **12**, 232 (2012).
30. Z. Jin, J. Gu, X. Xin, Y. Li, and H. Wang, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **35** (5), 519 (2014).
31. H. Ogawa, H. Nagano, M. Konno, et al., *Mol. Clin. Oncol.* **3** (3), 563 (2015).
32. A. Lyshchik, T. Higashi, T. Hara, et al., *Cancer Invest.* **25** (3), 154 (2007).
33. R. S. Brown, T. M. Goodman, K. R. Zasadny, et al., *Nucl. Med. Biol.* **29** (4), 443 (2002).
34. M. Bianchi, R. Crinelli, G. Serafini, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1360** (3), 211 (1997).
35. K. Murakami and S. Piomelli, *Blood* **89** (3), 762 (1997).
36. S. P. Mathupala, C. Heese, and P. L. Pedersen, *J. Biol. Chem.* **272** (36), 22776 (1997).
37. T. Binderup, U. Knigge, B. H. Federspiel, et al., *Diagnostics* **3** (4), 372 (2013).
38. M. Z. Qiu, B. Han, H. Y. Luo, et al., *Tumour Biol.* **32** (1), 159 (2011).
39. A. Matsutani, R. Janssen, H. Donis-Keller, and M. A. Permutt, *Genomics* **12** (2), 319 (1992).

Evaluation of Gene Expression of Hexokinases in Colorectal Cancer with the Use of Bioinformatics Methods

G.S. Krasnov*, **A.A. Dmitriev***, **A.F. Sadritdinova***, **M.S. Fedorova***, **A.V. Snezhkina***,
N.V. Melnikova*, **A.V. Poteryakhina***, **K.M. Nyushko****, **M.M. Belyakov****,
A.D. Kaprin**, **A.R. Zaretsky*****, and **A.V. Kudryavtseva***

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Herzen Moscow Cancer Research Institute, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
2-j Botkinsky proezd 3, Moscow, 125284 Russia

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

One of the hallmarks of cancer is the change of energy metabolism, mainly activation of glycolysis that occurs even at early stages of tumorigenesis. The glycolysis activation can be caused by overexpression of hexokinases, primarily HK1 and HK2. Colorectal cancer, which takes the third place in the cancer morbidity and mortality rates worldwide, is believed to be accompanied with overexpression of HK2, which is considered a marker of poor prognosis. With the use of the developed CrossHub tool, we performed the analysis of the Cancer Genome Atlas RNA-Sequencing data, which, on the contrary, revealed the prevalence of the down-regulation of *HK2* gene and only slight expression alterations in *HK1* gene. The Cancer Genome Atlas is the largest resource in the field of molecular oncology that accumulated genomic, transcriptomic and methylomic data for thousands of sample of more than 20 cancers. The transcriptome analysis data for colorectal cancer (283 tumor samples and 41 matched normal samples) were in accord with the results of further qPCR expression level evaluation. Up-regulation of *HK1* and *HK2* genes was observed only in a part of samples: 12% for *HK1* and 30% for *HK2*. At the same time, the *HK2* mRNA level decrease was shown in 50% of cases. Correlation analysis revealed the consistency in *HK1* and *HK2* expression alterations (Spearman's rank correlation coefficient $r_s = 0.43$, $p < 0.01$), that could be explained by common deregulation mechanisms of these genes in colorectal tumors. The *HK3* expression level was significantly increased in 60% of samples. Most likely, just hexokinase 3 contributes significantly to the activation of glycolysis in colorectal cancer.

Key words: transcriptome analysis, differential gene expression, hexokinase, energy metabolism, glycolysis, Warburg effect, The Cancer Genome Atlas Project, gene expression