

УДК 577.29

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ К ДЕЙСТВИЮ ЦИСПЛАТИНА И ПАКЛИТАКСЕЛА НА ОСНОВАНИИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ

© 2011 г. У. А. Боярских<sup>1,2</sup>, Ю. В. Кондрахин<sup>3,4</sup>, И. С. Евшин<sup>3,5</sup>, Р. Н. Шарипов<sup>3,5</sup>,  
А. В. Комельков<sup>6</sup>, Е. А. Мусаткина<sup>6</sup>, Е. М. Чевкина<sup>6</sup>, М. А. Сукоян<sup>1</sup>,  
Ф. А. Колпаков<sup>3,4</sup>, К. Н. Кашкин<sup>7</sup>, М. Л. Филипенко<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, 630090

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090

<sup>3</sup>ООО “Институт системной биологии”, Новосибирск, 630090

<sup>4</sup>Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, 630090

<sup>5</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

<sup>6</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук,  
Москва, 115478

<sup>7</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

Поступила в редакцию 22.10.2010 г.

Принята к печати 14.12.2010 г.

Цель данной работы — определение молекулярных маркеров, характеризующих чувствительность клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) к действию цисплатина и паклитаксела. Одним из возможных прогностических критериев может быть уровень экспрессии генов белков, участвующих в формировании хеморезистентности. В качестве вероятных маркерных генов нами выбрано 44 гена из числа кодирующих АТФ-зависимые транспортные белки, белки системы детоксификации, белки системы репарации, тубулин и белки, регулирующие его синтез; а также гены белков, контролирующие клеточный цикл и апоптоз. Исследование выполнено на восьми клеточных линиях НМРЛ (A549, Calu1, H1299, H322, H358, H460, H292, H23). Цитотоксическая концентрация паклитаксела и цисплатина, а также уровень экспрессии 44 кандидатных генов определены для каждой линии НМРЛ. На основании полученных данных построены уравнения регрессии, предсказывающие чувствительность клеток НМРЛ к химиопрепаратам в зависимости от уровня экспрессии маркерных генов. В результате получена регрессионная модель, которая по уровню экспрессии 11 генов: *TUBB3*, *TXR1*, *MRP5*, *MSH2*, *ERCC1*, *STMN*, *SMAC*, *FOLR1*, *PTPN14*, *HSPA2* и *GSTP1* — предсказывает цитотоксическую концентрацию паклитаксела с коэффициентом корреляции между предсказанными и эмпирическими значениями  $r = 0.91$  ( $p < 0.01$ ). В то же время ни одна из полученных регрессионных моделей не позволяла надежно предсказывать чувствительность клеток НМРЛ к цисплатину.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легких, хеморезистентность, цисплатин, паклитаксел, уровень экспрессии генов.

PREDICTION OF A NON-SMALL CELL LUNG CANCER SENSITIVITY TO CISPLATIN AND PACLITAXEL BASED ON THE MARKER GENES EXPRESSION by U. A. Boyarskiĭ<sup>1,2</sup>, Yu. V. Kondrakhin<sup>3,4</sup>, I. S. Yevshin<sup>3,5</sup>, R. N. Sharipov<sup>3,5</sup>, A. V. Komelkov<sup>6</sup>, E. A. Musatkina<sup>6</sup>, E. M. Tchevkina<sup>6</sup>, M. A. Sukoyan<sup>1</sup>, F. A. Kolpakov<sup>3,4</sup>, K. N. Kashkin<sup>7</sup>, M. L. Filipenko<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia, \*e-mail: max@niboch.nsc.ru; <sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; <sup>3</sup>Institute of System Biology, Novosibirsk, 630090 Russia; <sup>4</sup>Design Technological Institute of Digital Techniques, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; <sup>5</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; <sup>6</sup>Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia; <sup>7</sup>Shemyakin and Ovchinnikov

Принятые сокращения: МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого.  
\* Эл. почта: max@niboch.nsc.ru

Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia). The goal of the present study was to define gene expression signatures that predict a chemosensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) to cisplatin and paclitaxel. To generate set of candidate genes likely to be predictive a current knowledge of the pathways involved in resistance and sensitivity to individual drugs was used. Forty four genes coding proteins belonging to following categories: ATP-dependent transport proteins, detoxification system proteins, reparation system proteins, tubulin and proteins responsible for its synthesis, cell cycle and apoptosis proteins were considered. Eight NSCLC cell lines (A549, Calu1, H1299, H322, H358, H460, H292, and H23) were used in our study. For each NSCLC cell line a cisplatin and paclitaxel chemosensitivity as well as an expression level of 44 candidate genes were evaluated. To develop a chemosensitivity prediction model based on selected genes expression level a multiple regression analysis was performed. The model based on the expression level of 11 genes (*TUBB3*, *TXR1*, *MRP5*, *MSH2*, *ERCC1*, *STMN*, *SMAC*, *FOLR1*, *PTPN14*, *HSPA2*, *GSTP1*) allowed us to predict the paclitaxel cytotoxic concentration with high level of correlation ( $r = 0.91$ ,  $p < 0.01$ ). However, none model developed was able to reliably predict a sensitivity of the NSCLC cells to cisplatin.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, cisplatin, paclitaxel, resistance prediction, gene expression.

Современные схемы лечения немелкоклеточно-го рака легкого (НМРЛ) включают курсы химиотерапии. Различные протоколы предполагают назначение препаратов на основе платины в качестве монотерапии или в комбинации с паклитакселом, эпопозидом, гемцитабином и некоторыми другими препаратами. Однако при использовании общих схем химиотерапии положительного клинического ответа удается достигнуть лишь у 20–30% пациентов [1]. В большинстве же случаев опухоли оказываются резистентными к химиотерапии. Возможность индивидуального подхода при выборе комбинации и дозы химиопрепаратов имеет исключительное значение для клинической онкологии.

Одним из направлений исследований в этой области является поиск молекулярных маркеров, позволяющих прогнозировать действие химиопрепарата на клетки опухоли. Таким маркером может быть количество мРНК генов, дифференциально экспрессирующихся в чувствительных и резистентных к химиопрепарату клетках. Как правило, выбор маркерных генов осуществляется одним из двух способов. Первый заключается в скрининге нескольких десятков тысяч генов. Для этого при помощи гибридизационных чипов определяется количество мРНК 10–30 тыс. генов в образцах с известной чувствительностью к химиопрепарату и выбираются те гены, которые максимально дискриминируют чувствительные и резистентные образцы. Второй способ подразумевает выбор “генов-кандидатов” на основании имеющихся знаний о молекулярных механизмах хеморезистентности.

В данной работе использован второй подход. Цель исследования состояла в том, чтобы сформировать группу кандидатных маркерных генов и проверить возможность предсказания чувствительности клеток восьми линий НМРЛ (A549, Calu1, H1299, H322, H358, H460, H292 и H23) к действию препаратов цисплатин и паклитаксел в зависимости от уровня транскрипции этих генов. Кроме того, нами рассмотрены некоторые особенности анализа данных, наиболее критичные для построения на-

дежной модели, предсказывающей ответ клеток на действие химиопрепарата.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование клеточных линий НМРЛ.** В работе использовали клетки НМРЛ восьми линий: A549, Calu1, H1299, H322, H358, H460, H292 и H23. Клетки культивировали в 25-мл флаконах в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, 0.03% глутамина и канамицин в концентрации 100 мкг/мл, при 37°C и 5%-ном содержании CO<sub>2</sub> в атмосфере. Культуральную среду заменяли каждые 24 часа. При достижении культурой плотности 70–80% от монослоя клетки пересеивали с разведением в 4 раза.

**Определение чувствительности клеток НМРЛ к химиопрепаратам.** Чувствительность клеток к цисплатину и паклитакселу (оба препарата фирмы “Sigma”) оценивали по значению параметра  $IC_{50}$  (inhibitory concentration; концентрация препарата, при которой в культуре наблюдается деление 50% клеток). Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, высевали в лунки 96-луночного планшета по 2–5 тыс. клеток на лунку и через 24 ч культуральную среду заменяли на свежую, содержащую цисплатин или паклитаксел в различной концентрации. Концентрацию паклитаксела варьировали от 0.001 до 1 мкМ, а цисплатина — от 0.5 до 40 мкМ. Через 48 ч после добавления химиопрепарата определяли долю жизнеспособных клеток при помощи МТТ-теста [2].

**Определение количества мРНК кандидатных генов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.** Для каждой клеточной линии НМРЛ определяли относительный уровень экспрессии 44 кандидатных генов (таблица). Для этого клетки, не подвергавшиеся воздействию цитостатиков и находящиеся в экспоненциальной фазе роста, высевали в лунки 6-луночного планшета и культивировали до 80%-ной плотности монослоя. После этого культуральную среду удаляли, а клетки лизировали реагентом Trisol (“Invitrogen”). Полученные препараты хранили при –70°C.

Кандидатные гены (44), которые могут быть информативными маркерами при прогнозировании хеморезистентности\*

Гены	Резистентность к паклитакселу
<i>TUBB3, STMN1</i> <i>TXR, TSP1</i>	Сохранение равновесия между процессами полимеризации и деполимеризации тубулина [3, 4]. TXR предотвращает таксан-индуцированный апоптоз благодаря down-регуляции транскрипции TSP1 (тромбоспондин-1) [5].
<b>Резистентность к цисплатину</b>	
<i>ERCC1, XPC, DDB2, MLH1, MSH2, BRCA1**</i> <i>YB1</i>	Гены белков системы репарации [6–9]. ДНК-связывающий белок, связывается преимущественно с цисплатин-модифицированными участками ДНК, предположительно участвует в распознавании ДНК-аддуктов комплексом репарации [10].
<i>TXN, TXNIP, CYB5R3</i> <i>AKR1B10**</i>	Адаптивный антиоксидантный ответ [11]. Опосредовано ингибирует сигнальный путь рецептора ретиноевой кислоты [12].
<b>Неспецифичная резистентность</b>	
<i>MDR, MRP1, MRP3, MRP5, BCRP</i> <i>AQP1, FOLR1, SLC34</i> <i>GSTP1</i> <i>TP53, PML, BRCA1**, DAPK1, RIPK2, BAX, SMAC</i> <i>BIRC5, BCL2</i> <i>HSPA2</i> <i>EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, IGFR</i> <i>PTPN14</i> <i>TIMP1, FBLN1</i> <i>CAVI</i> <i>AKR1B10**, AKR1B1</i> <i>SFN</i>	АТФ-зависимые транспортные белки [13, 14]. Мембранные транспортные белки [15]. Детоксикация ксенобиотиков [16]. Проапоптотические факторы [17–19]. Антиапоптотические факторы [18, 19]. Белок теплового шока семейства Hsp70, способствует выживанию клеток и обеспечивает перекрестную толерантность к различным повреждающим агентам [20]. Тирозинкиназные рецепторы, участвуют в регуляции клеточной пролиферации [21]. Дефосфорилирование β-катенина, потеря межклеточных контактов и активация wnt-пути [22]. Компоненты внеклеточного матрикса [23]. Основной компонент специализированных доменов плазматической мембраны клетки (кавеол); модулируя активность мембранных рецепторов, <i>CAVI</i> регулирует различные сигнальные пути, ассоциирован с хеморезистентностью [24, 25]. Дифференциально экспрессируются в клетках НМРЛ при курении [26]. Экспрессируется в дифференцированных эпителиальных клетках, репрессирован в опухолевых клетках, опосредует G2-арест клеточного цикла в ответ на генотоксичное воздействие [27].

\* Гены выбраны на основании их участия в формировании резистентности опухолевых клеток к химиотерапии.

\*\* Обозначены гены, приведенные в таблице дважды.

Выделение суммарной клеточной РНК и последующий синтез кДНК в реакции обратной транскрипции выполняли одновременно для всех образцов. Суммарную РНК выделяли согласно рекомендациям “Invitrogen”. Реакцию обратной транскрипции проводили при 42°C в течение 45 мин в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Трис-НСl (рН 8.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ, 100 мМ KCl, 0.2 мМ dNTPs, статистический 9-нуклеотидный праймер (10 нг/мкл), 200 U MoMLV РНК-зависимой ДНК-полимеразы и от 200 нг до 1 мкг суммарной РНК. При помощи метода ПЦР в режиме реального времени в каждом из полученных образцов кДНК определяли относительное количество кДНК каждого из 44 генов. Амплификацию образцов кДНК

проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Трис-НСl (рН 8.9), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 55 мМ KCl, 0.2 мМ dNTPs, 0.5 U Taq-полимеразы и SybrGreen I (“Invitrogen”) в разведении 1 : 25000, а также соответствующую пару прямого и обратного праймеров (по 300 нМ каждого) и образец кДНК (5–25 нг). Количество кДНК в условных единицах рассчитывали с учетом нормировочного коэффициента, рассчитанного как среднее геометрическое количества кДНК генов *POLR2A*, *GAPDH*, *RPL32* и *ACTB*.

**Анализ данных.** Анализ данных выполняли при помощи компьютерной платформы R (версия 2.10.1) для статистических вычислений (<http://>

www.r-project.org). Линии клеток НМРЛ были упорядочены в соответствии с величиной  $IC_{50}$  цисплатина и паклитаксела и поделены на группы чувствительных ( $n = 4$ ) и резистентных ( $n = 4$ ) к соответствующему препарату клеток. Для каждого гена определили коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) между количеством мРНК и значением  $IC_{50}$ . Кроме того, на основании критерия Стьюдента ( $t$ ) для каждого гена оценили значимость различий между уровнем экспрессии в чувствительных и резистентных клеточных линиях.

Построение функции, предсказывающей значение  $IC_{50}$  в зависимости от уровня экспрессии мРНК генов-предикторов, выполняли при помощи множественной линейной регрессии. Мы рассмотрели два варианта включения генов-предикторов в уравнение регрессии. В одном случае выбор генов для включения в регрессионную модель проводили методом пошаговой регрессии. В другом случае в качестве предикторов уравнения регрессии использовали новые переменные, переопределенные с помощью метода главных компонент (пять компонент). Для обоих вариантов регрессионного анализа в качестве переменных использовано небольшое (5–15) подмножество генов. Указанное подмножество формировали из генов, характеризующихся либо максимальным значением  $r$ , либо максимальным значением  $t$ . Число генов в подмножестве уменьшали постепенно от 15 до 5, при этом каждый раз оценивали качество полученной прогнозирующей функции. Основным критерием оценки прогнозирующей функции служила устойчивость (надежность) предсказания. Надежность прогнозирующих функций оценивали с помощью метода складного ножа (JackKnife), представляющего собой один из методов перекрестного обоснования: для этого из анализа последовательно исключали по одной из клеточных линий, а прогнозирующую функцию строили с использованием оставшихся клеточных линий. Таким образом, метод “складного ножа” позволил нам оценить эффективность предсказаний  $IC_{50}$  для тех клеточных линий, которые не участвовали в процессе построения прогнозирующей функции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном исследовании сформирована группа кандидатных генов (44 гена) и определен уровень их экспрессии в клетках восьми линий НМРЛ; кроме того, проведена оценка чувствительности этих клеток к часто используемым химиопрепаратам (паклитакселу и цисплатину). Используя данные по экспрессии 44 генов в качестве прогностических факторов, мы построили ряд регрессионных моделей, которые с различной степенью надежности предсказывали чувствительность клеток НМРЛ к этим химиопрепаратам.

### Формирование группы кандидатных генов

Кандидатные гены выбирали на основании существующих представлений о механизмах хеморезистентности опухолей. Раковые клетки могут проявлять устойчивость только к одной группе химиопрепаратов (специфическая резистентность) или к широкому спектру разнообразных препаратов (множественная лекарственная устойчивость, МЛУ). Доказано, что одна из причин МЛУ – повышение уровня экспрессии мембранных белков, осуществляющих транспорт химических соединений из клетки во внеклеточное пространство. Чрезмерно активный транспорт препятствует накоплению химиопрепарата в клетке до терапевтически значимых концентраций. Многие белки, действие которых связывают с МЛУ, относятся к классу АТФ-зависимых транспортных белков, к ним относятся Р-gp (ABCB1, кодируется геном *MDR1*), MRP1 (ABCC1), MRP3 (ABCC3), MRP5 (ABCC5), BCRP (ABCG2) и другие [13, 14]. Еще один механизм МЛУ – увеличение активности внутриклеточных систем детоксикации, в частности, глутатион S-трансфераз (GSTs) – семейства ферментов, осуществляющих метаболизм ксенобиотиков. Детоксикация химических соединений ферментами этой группы производится за счет их конъюгации с восстановленным глутатионом. Один из наиболее изученных в этой группе ферментов – GSTP1 [16].

Причины специфической резистентности клеток опухоли определяются механизмом действия конкретного химиопрепарата. В частности, цисплатин – препарат, содержащий соединения платины. В основе его цитостатического эффекта лежит способность комплексов  $Pt^{2+}$  и  $Pt^{4+}$  образовывать координационные связи с гуаниновыми основаниями ДНК [28]. Формирование многочисленных ДНК-аддуктов и сшивок увеличивает частоту ошибок репликации, что, в свою очередь, инициирует остановку клеточного цикла и активацию механизмов апоптоза. Чрезмерная активность систем репарации ДНК в клетках опухоли нейтрализует цитостатический эффект цисплатина. Таким образом, маркером резистентности клеток опухоли к цисплатину может послужить изменение экспрессии генов, ответственных за репарацию ДНК. Из их числа мы выбрали гены *ERCC1*, *XPC*, *DDB2*, *MLH1* и *MSH2* [6–9]. Цисплатин взаимодействует не только с ядерной ДНК, но также с митохондриальной ДНК и с некоторыми из потенциал-зависимых митохондриальных белков. С этим свойством связывают способность цисплатина индуцировать клеточный апоптоз через активацию митохондриального окислительного стресса [29–31]. Исходя из этого, в качестве вероятных маркерных генов мы рассматривали гены белков-антиоксидантов *TXN*, *TXNIP* и *CYB5R3* [14].

Другой химиопрепарат – паклитаксел (группа таксанов) – по механизму действия представляет

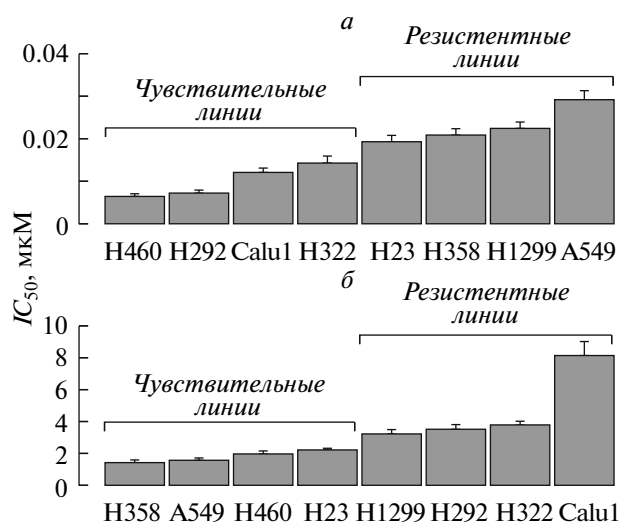


Рис. 1. Значения  $IC_{50}$  (среднее значение + SD) паклитаксела (а) и цисплатина (б) в клетках восьми линий НМРЛ.

собой антимиотический препарат. В клетке паклитаксел связывается с  $\beta$ -тубулином, основным структурным компонентом микротрубочек, и тем самым препятствует деполимеризации гетеродимеров тубулина. В результате образуются комплексы аномальных микротрубочек, не способных формировать митотическое веретено, вследствие чего полностью блокируется процесс деления клетки [32, 33]. Один из известных специфических механизмов устойчивости клеток опухоли к действию паклитаксела — повышенная экспрессия  $\beta$ III-тубулина (TUBB3), одного из изоформ  $\beta$ -тубулина, который в меньшей степени связывается с паклитакселом по сравнению с другими изоформами этого белка [3]. Другой причиной устойчивости клеток к паклитакселу может быть увеличение экспрессии белка статина (продукта гена *STMN1*), который связывает свободные гетеродимеры тубулина и этим способствует дестабилизации микротрубочек [4]. Кроме своего прямого антимиотического действия препараты группы таксанов также стимулируют экспрессию тромбоспондина (TSP). Тромбоспондин — белок внеклеточного матрикса, связываясь с рецепторами CD36 и CD47, индуцирует апоптоз. Экспрессия гена *TSP1* репрессируется белком TXR (taxol-resistance), таким образом, TXR опосредует резистентность клеток к таксанам [5].

Цитотоксический эффект большинства химиопрепаратов, в конечном счете, реализуется через остановку деления и индукцию апоптоза в клетках. Поэтому нарушение экспрессии белков, контролирующих клеточный цикл, таких как p53, BRCA1, PML, SFN, а также факторов непосредственно стимулирующих (BAX, DAPK1, RIPK2, Smac/diablo) и ингибирующих (BIRC5) апоптоз, может приводить к хеморезистентности опухолевой клетки [17–19].

Помимо вышеперечисленных, в качестве возможных маркерных генов нами рассмотрены гены тирозинкиназных рецепторов семейства рецепторов EGF (epidermal growth factor), стимулирующих пролиферацию эпителиальных клеток, а также некоторые из генов, дифференциально экспрессирующихся в нормальных и опухолевых клетках. В итоге нами сформирована группа, включающая 44 кандидатных гена (таблица).

#### Определение чувствительности клеток НМРЛ к действию цисплатина и паклитаксела

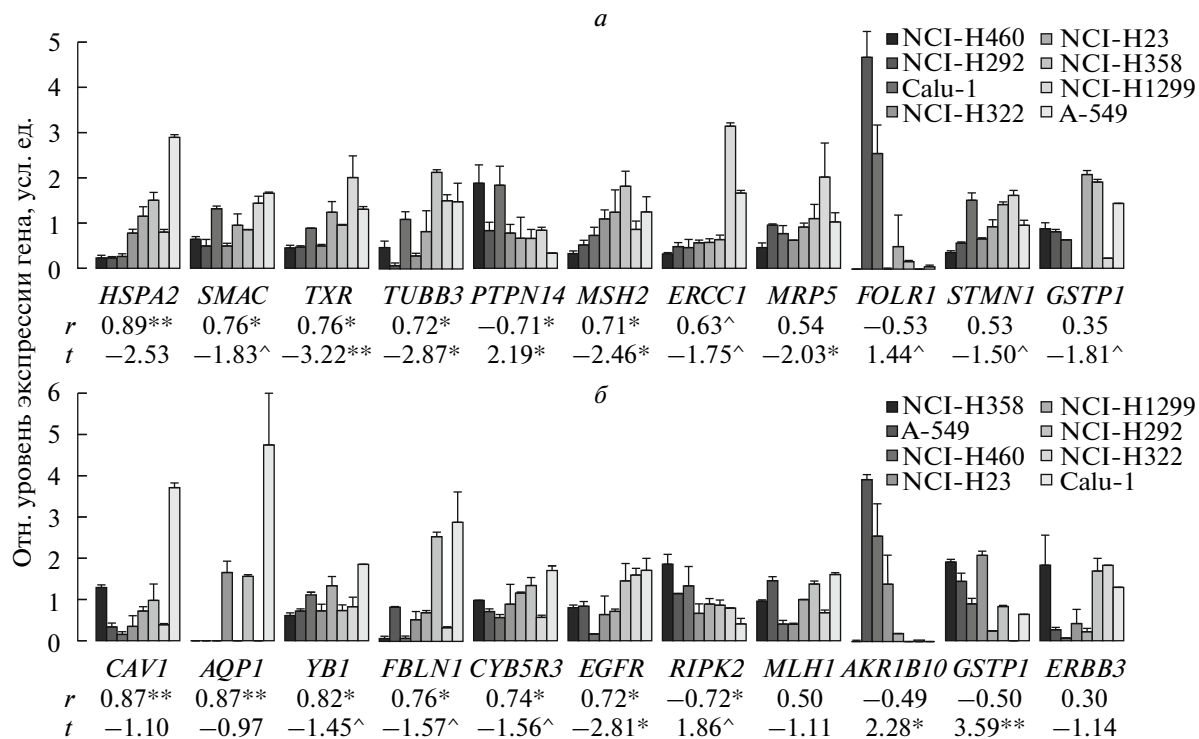
Чувствительность клеток НМЛР к паклитакселу и цисплатину оценивали по значению параметра  $IC_{50}$  для каждой из 8 клеточных линий (рис. 1а, б). На основании экспериментально полученных для каждого из химиопрепаратов значений  $IC_{50}$  линии НМРЛ подразделили на чувствительные и устойчивые. Среднее значение  $IC_{50}$  составляло  $0.0097 \pm 0.0038$  мкМ для чувствительных к паклитакселу линий (NCI-H460, NCI-H292, Calu-1, NCI-H322) и  $0.0225 \pm 0.0045$  мкМ для резистентных линий (NCI-H23, NCI-H358, NCI-H1299, A549). В случае цисплатина среднее значение  $IC_{50}$  составляло  $1.89 \pm 0.35$  мкМ для чувствительных (NCI-H358, A-549, NCI-H460 и NCI-H23) и  $4.78 \pm 2.34$  мкМ для резистентных (NCI-H1299, NCI-H292, NCI-H322 и Calu-1) линий.

Значимой корреляции между чувствительностью линий НМРЛ к паклитакселу и цисплатину не наблюдалось.

#### Уровень экспрессии кандидатных генов в клетках НМРЛ

Относительное количество мРНК 44 генов в клетках НМРЛ оценивали с помощью метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени. После этого для всех кандидатных генов сопоставили количество мРНК со значением  $IC_{50}$  химиопрепарата в каждой клеточной линии и определили коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) между этими величинами (отдельно для паклитаксела и цисплатина), а также с помощью критерия Стьюдента ( $t$ ) оценили значимость различий в уровнях экспрессии каждой мРНК между группами чувствительных и устойчивых к химиопрепаратам линий.

Для большинства кандидатных генов, рассмотренных в этой работе, ни анализ корреляции, ни дисперсионный анализ не показали значимой зависимости между уровнем транскрипции и чувствительностью клеток к химиопрепаратам. На рис. 2а, б приведены профили экспрессии 11 генов, характеризующихся максимальными абсолютными значениями критериев  $r$  и  $t$  для препаратов цисплатина и паклитаксела. Видно, что значимая корреляция между величиной  $IC_{50}$  паклитаксела и количеством



**Рис. 2.** Профиль уровня экспрессии 11 генов (среднее значение + SD), для которых получены максимальные абсолютные значения критериев *r* и *t* для паклитаксела (а) и цисплатина (б). Линии приведены в порядке увеличения *IC*<sub>50</sub> соответствующего химиопрепарата; гены приведены в порядке возрастания коэффициента корреляции *r* между количеством мРНК и значением *IC*<sub>50</sub>. Условные обозначения: ^ – *p* ≤ 0.1 (при |*r*| ≥ 0.62, |*t*| ≥ 1.44); \* – *p* ≤ 0.05 (при |*r*| ≥ 0.71, |*t*| ≥ 1.94); \*\* – *p* ≤ 0.01 (при |*r*| ≥ 0.83, |*t*| ≥ 3.14).

мРНК наблюдается только для генов *HSPA2*, *SMAC*, *TXR1*, *TUBB3*, *PTPN14* и *MSH2*. Для этих же генов (за исключением *SMAC*), а также для гена *MRP5* имеет место статистически значимое различие между количеством мРНК в чувствительных и устойчивых к паклитакселу линиях.

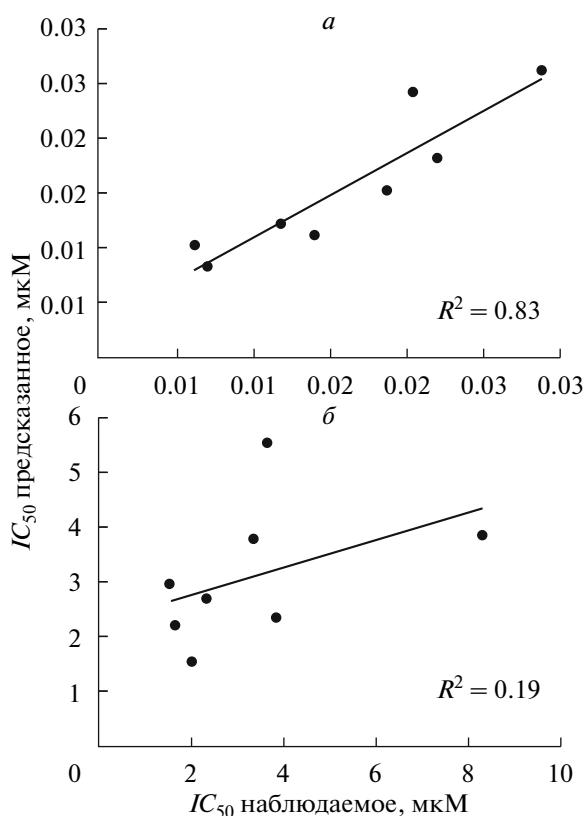
В случае цисплатина значимая корреляция между *IC*<sub>50</sub> и количеством мРНК найдена для генов *AQP1*, *CAV1*, *YB1*, *FBLN1*, *CYB5R3*, *RIPK2* и *EGFR*, при этом уровень мРНК значимо отличается в чувствительных и резистентных к цисплатину клетках только для генов *EGFR*, *AKR1B10* и *GSTP1*.

**Прогнозирование чувствительности клеток НМРЛ к действию цисплатина и паклитаксела в зависимости от уровня транскрипции кандидатных генов**

Используя методы регрессионного анализа, мы построили несколько линейных моделей, предсказывающих значения *IC*<sub>50</sub> для паклитаксела и цисплатина в зависимости от количества мРНК маркерных генов. Параметры уравнений регрессии определены с помощью метода пошаговой регрессии и (или) регрессионного анализа с использованием главных компонент.

Следует заметить, что характерная особенность наших экспериментальных данных заключалась в том, что число предикторов (44 гена, для которых определяли уровень экспрессии) значительно превосходило число наблюдений (всего восемь клеточных линий), в то время как методы регрессионного анализа требуют обратного соотношения. Решить эту проблему можно, снизив размерность выборки, т.е. уменьшив число предикторов. Применение подхода предварительного отбора подмножества генов позволило последовательно уменьшить число предикторов до 5–15. При этом использовано два варианта отбора: в подмножество включали гены с максимальным абсолютным значением или критерия *r* (вариант отбора О1), или *t* (вариант отбора О2).

В результате получен набор прогностических функций, отличающихся друг от друга по числу генов, варианту их отбора и использованному для построения функции метода регрессионного анализа. Эффективность каждой функции оценивали по двум величинам: CORR1 и CORR2, – которые характеризуют соответственно точность и надежность предсказания. Величину CORR1 рассчитывали как коэффициент корреляции между наблюдаемыми и предсказанными значениями *IC*<sub>50</sub> для каждой из восьми клеточных линий. Величину CORR2 вычисляли как коэффициент корреляции между наблю-



**Рис. 3.** Зависимость между наблюдаемыми значениями  $IC_{50}$  и предсказанными при помощи прогнозирующей функции с применением метода “складного ножа” для паклитаксела (а) и цисплатина (б).

даемыми значениями  $IC_{50}$  и значениями  $IC_{50}$ , предсказанными в результате применения метода “складного ножа” (JackKnife – один из бутстреп-методов прикладной статистики, позволяющий оценить устойчивость получаемых выводов).

Значения  $CORR1$  оказались достаточно высокими (от 0.90 до 0.99) для всех полученных функций. Значения  $CORR2$  существенно варьировали, но в большинстве случаев не были статистически значимыми ( $<0.71$ ). По сравнению с методом пошаговой регрессии регрессионный анализ с использованием главных компонент давал более устойчивое предсказание величины  $IC_{50}$  для обоих химиопрепаратов. Наиболее точное ( $CORR1 = 0.99$ ) и надежное ( $CORR2 = 0.91$ ) предсказание  $IC_{50}$  для паклитаксела достигалось при использовании метода регрессионного анализа на пять главных компонент, при этом прогностическими параметрами служили 11 генов, выбранных способом **O2**.

Уравнение регрессии, определяющее зависимость между  $IC_{50}$  паклитаксела и количеством мРНК 11 маркерных генов, имело следующий вид:

$$F = 7 + 1.6 * TUBB3 + 0.3 * TXR1 + 0.2 * MRP5 + 2.4 * MSH2 + 0.03 * ERCC1 + 1.9 * STMN + 0.3 * SMAC - 1.3 * FOLR1 + 0.3 * PTPN14 + 2.1 * HSPA2 + 0.4 * GSTP1.$$

Независимые переменные TUBB3, TXR1, MRP5, ..., GSTP1 представляют собой значения количества мРНК соответствующих генов в условных единицах, определенных относительно количества мРНК в калибровочном образце. На рис. 3а представлена графическая зависимость между наблюдаемыми и предсказанными при помощи полученной функции значениями  $IC_{50}$  для паклитаксела. Профили экспрессии 11 маркерных генов, обеспечивающих наиболее устойчивое предсказание величины  $IC_{50}$  для паклитаксела, приведены на рис. 2а.

В случае цисплатина ни одна из функций не позволяла надежно предсказывать значение  $IC_{50}$ . Максимальное (но статистически незначимое) значение  $CORR2$  достигалось при тех же условиях что и для паклитаксела, но с использованием варианта отбора **O1**, при этом  $CORR1 = 0.99$ , а  $CORR2 = 0.58$ . (рис. 3б). На рис. 2б приведены значения относительного количества мРНК для 11 маркерных генов, обеспечивающих наиболее устойчивое предсказание величины  $IC_{50}$  для цисплатина.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании известных механизмов устойчивости опухолевых клеток к действию цисплатина и паклитаксела сформирована группа генов, уровни экспрессии которых, предположительно, могут служить маркерами хеморезистентности. В дальнейшем данные о количестве мРНК этих генов использованы нами для моделирования уравнений регрессии, предсказывающих ответ клеток НМРЛ на действие цисплатина и паклитаксела. Моделирование проводили на клетках НМРЛ восьми линий, для которых предварительно определяли значения  $IC_{50}$  этих двух препаратов.

Один из недостатков проведенного нами исследования – использование небольшого по сравнению с количеством анализируемых генов числа линий НМРЛ. Методы регрессионного анализа очень чувствительны к размерности выборки, поэтому различные подходы, уменьшающие число предикторов, способствуют получению более надежного предсказания. Метод главных компонент, использованный нами для переопределения независимых переменных регрессионной модели, считается эффективным способом снижения размерности выборки. Наиболее часто этот метод применяют при построении прогностических функций на основании данных, полученных при анализе экспрессии генов с помощью микрочипов, что включает десятки тысяч измерений. В нашем случае регрессион-

ный анализ на пять главных компонент также позволял получить более надежное предсказание, чем метод пошаговой регрессии.

Другой способ уменьшения размерности выборки — предварительный отбор небольшого подмножества генов-предикторов. Мы сравнивали два варианта отбора генов: **O1** (на основании величины корреляции  $r$  между количеством мРНК и  $IC_{50}$ ) и **O2** (на основании значимости различий экспрессии генов в чувствительных и резистентных к химиопрепарату линиях  $t$ ). Вариант отбора информативных генов **O2** стоит признать более распространенным. Однако при отборе генов по этому принципу необходимо заранее (искусственно) задать пороговое значение  $IC_{50}$  и на основании его подразделить клеточные линии на чувствительные и резистентные. Кроме того, измерение значений  $IC_{50}$ , как правило, проводится с определенной стохастической ошибкой. Таким образом, высока вероятность ложной классификации линии. На сегодняшний день нет общепринятого метода определения порогового значения  $IC_{50}$ . В работе Потти (Potty A.) и др. [34] пороговые значения  $IC_{50}$  для чувствительных и резистентных линий задавались как среднее значение  $IC_{50} \pm 1 SD$  (стандартное отклонение). При определении порогового значения  $IC_{50}$  таким способом сравниваемые нами группы содержали бы 1) две чувствительных и одну резистентную к паклитакселу и 2) одну чувствительную и одну резистентную к цисплатину линии. Очевидно, что такого числа линий недостаточно для проведения анализа; поэтому мы задали пороговое значение  $IC_{50}$  таким образом, чтобы число чувствительных и резистентных линий для обоих химиопрепаратов было одинаковым (в каждой группе по 4 линии). При таком подходе средние значения  $IC_{50}$  резистентных и чувствительных линий значимо отличались друг от друга ( $p \leq 0.005$  для паклитаксела и  $p \leq 0.05$  для цисплатина), в то время как межгрупповая дисперсия была значительно меньше, чем при определении порогового  $IC_{50}$  способом, использованным в работе Потти и др. [34]. Так как неверная классификация линий может повлиять на результаты при выборе подмножества генов-предикторов способом **O2**, мы использовали дополнительный способ отбора **O1**, не требующий предварительной классификации линий.

При выборе генов для предсказания значения  $IC_{50}$  паклитаксела оба способа (**O1** и **O2**) позволяли получить уравнение регрессии со статистически значимым CORR2, однако значение CORR2, полученное при использовании способа **O2** (0.91) было выше, чем для способа **O1** (0.86). Значит, предсказание, полученное при отборе **O2**, следует считать более надежным. В случае цисплатина ни один из способов отбора не позволил получить надежное предсказание: наиболее высокое, но статистически незначимое значение CORR2 (0.58) получено при выборе генов способом **O1**.

В итоге мы получили уравнение регрессии, относительно эффективно предсказывающее чувствительность клеток восьми линий НМРЛ к паклитакселу. Несмотря на это, можно сделать вывод, что большинство кандидатных генов, рассмотренных в нашей работе (за исключением 11, используемых в прогностической модели для паклитаксела), оказались малоинформативными прогностическими маркерами, так как их использование не позволяло дискриминировать чувствительные и резистентные линии НМРЛ.

Следует заметить, что для некоторых из кандидатных генов (рис. 2) наблюдалась статистически значимая зависимость между количеством мРНК и ответом клеток на действие химиопрепаратов. Так, по сравнению с чувствительными к паклитакселу линиями НМРЛ в устойчивых клетках более высокий уровень экспрессии гена *PTPN14* и более низкие уровни экспрессии генов *HSPA2*, *TUBB3*, *TXR1*, *MRP5*, *MSH2* и *SMAC*. Резистентность клеток к цисплатину сочеталась с меньшей экспрессией генов *RIPK2*, *AKR1B10*, *GSTP1* и большей экспрессией генов *FBLN1*, *CYB5R3*, *AQP1*, *CAV1*, *EGFR* и *YB1*. Наблюдаемая зависимость между уровнями экспрессии перечисленных генов (всех, за исключением *AKR1B10* и *GSTP1*) и величиной  $IC_{50}$  согласуется с существующими представлениями об их участии в формировании хеморезистентности. В случае генов *AKR1B10* и *GSTP1* получены противоречивые результаты. Так, исходя из функциональной роли соответствующих ферментов, *AKR1B10* и *GSTP1*, увеличение уровня транскрипции этих генов должно приводить к увеличению резистентности клеток к цисплатину [12, 16], однако мы наблюдали обратную зависимость. Помимо этого, достаточно неожиданным кажется тот факт, что из числа генов, кодирующих белки системы репарации, только экспрессия *MLH1* очень слабо коррелировала с устойчивостью клеток к цисплатину ( $r = 0.5$ ). Увеличение активности белков системы репарации считается одним из важных факторов, обуславливающих устойчивость клеток к этому препарату [6, 7, 9]. Кроме *MLH1*, определен относительный уровень экспрессии мРНК генов *ERCC1*, *XPC*, *DDB2* и *MSH2*, кодирующих белки репарации; однако ни для одного из них не получено корреляции между количеством мРНК и значением  $IC_{50}$  для цисплатина. В то же время, экспрессия генов *MSH2* ( $r = 0.71$ ,  $t = 2.45$ ,  $p \leq 0.05$ ) и *ERCC1* ( $r = 0.62$ ,  $t = 1.74$ ,  $p \leq 0.1$ ) коррелировала с устойчивостью клеток к паклитакселу, хотя повреждение клеточной ДНК не рассматривается как цитотоксическое действие паклитаксела.

Какова же причина несоответствия полученных нами результатов с современными представлениями о механизмах хеморезистентности? Во-первых, число анализируемых в работе линий относительно невелико, поэтому нельзя исключить появления случайной корреляции между уровнем экспрессии



некоторых генов и типом клеток; хотя использованный в работе “метод складного ножа” в некоторой степени предупреждает включение таких случайных маркеров в модель. Во-вторых, некоторая вариативность возможна при определении чувствительности клеток к химиопрепаратам, например, за счет отличий в плотности посева клеток сравниваемых линий.

Помимо вышперечисленных причин, связанных с несовершенством экспериментальной модели, могут быть и такие. Например, не всегда количество мРНК гена отражает количество и активность соответствующего белка. Кроме того, в зависимости от условий, роль белка в формировании хеморезистентности может меняться. Не исключено также, что многие из информативных генов-предикторов представляют собой “суррогатные” маркеры. Изменение уровня мРНК таких генов может быть следствием транскрипционной корегуляции с другими генами, которые и обуславливают хеморезистентность клеток.

Таким образом, на основании известных механизмов хеморезистентности нами сформирована группа из 44 кандидатных генов, для которых уровень экспрессии мог быть прогностически значимым маркером устойчивости клеток НМРЛ к действию цисплатина и паклитаксела. Из них 11 генов (*TUBB3*, *TXR1*, *MRP5*, *MSH2*, *ERCC1*, *STMN*, *SMAC*, *FOLR1*, *PTPN14*, *HSPA2*, *GSTP1*) оказались информативными для предсказания устойчивости к паклитакселу на модели восьми линий клеток НМРЛ. В результате получено уравнение регрессии, предсказывающее значение  $IC_{50}$  паклитаксела в зависимости от уровня экспрессии мРНК вышперечисленных генов. В то же время, ни одна из полученных регрессионных моделей не позволяла надежно предсказывать чувствительность клеток НМРЛ к цисплатину. По-видимому, выбранная группа кандидатных генов не содержит информативных маркеров устойчивости к цисплатину, или использованный набор клеточных линий НМРЛ не содержит достаточного для эффективного моделирования числа линий, контрастных по чувствительности к этому препарату.

Несмотря на то, что полученная для паклитаксела модель надежно предсказывает резистентность клеток линий НМРЛ к этому препарату, высока вероятность, что она окажется малоэффективной при прогнозировании хеморезистентности клеток опухоли индивидуальных пациентов. Исследование выполнено на культурах клеточных линий НМРЛ, представляющих собой очень упрощенную модель первичной опухоли легких. Кроме того, в клетках линий НМРЛ реализованы лишь некоторые из возможных механизмов хеморезистентности, в то время как все другие фенотипы резистентности оказались вне процесса построения прогнозирующей функции. Так что полученные прогнозирующие

функций в дальнейшем предстоит проверить и откорректировать с учетом экспрессии генов в клетках первичных опухолей.

Авторы благодарят академика Е.Д. Свердлова за внимание к работе и критические замечания, а также Е.С. Копанцева, Т.В. Виноградову и И.Б. Зборовскую за помощь в организации работы.

Работа выполнена при поддержке грантами Федеральной целевой программы 2007-02-2.2-05-01-006, Государственного контракта 02.740.11.0085 (2009-1.1-202-019-076), Научной школы – 2395.2008.4, NSH-5638.2010.4 и программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Величко С.А., Миллер С.В., Тузиков С.А. и др. 2008. Спиральная компьютерная томография в оценке эффективности неадьювантной химиотерапии немелкоклеточного рака легкого. *Сибирский онкологический журн.* **3**, 66–69.
2. Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D.F. 1994. A study of the reproducibility of the MTT test. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **5**, 154–159.
3. Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A., et al. 1997. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. *J. Clin. Invest.* **100**, 1282–1293.
4. Curmi P.A., Andersen S.S., Lachkar S., et al. 1997. The stathmin/tubulin interaction *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**, 25029–25036.
5. Chih-Jian Lih, Wensheng Wei, Cohen S.N. 2006. Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. *Genes Dev.* **20**, 2082–2095.
6. Rosell R., Lord R.V., Taron M., Reguart N. 2002. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* **38**, 217–227.
7. Ferry K.V., Hamilton T.C., Johnson S.W. 2000. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of *ercc1-xpf*. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1305–1313.
8. Gan Wang, Lynn Chuang, Xiaohong Zhang, et al. 2004. The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2231–2240.
9. Topping R.P., Wilkinson J.C., Scarpinato K.D. 2009. Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 14029–14039.
10. Takayuki Torigoe, Hiroto Izumi, Hiroshi Ishiguchi, et al. Cisplatin Resistance and Transcription Factors. *Curr. Med. Chem.* **5**, 15–27.
11. Biaglow J.E., Miller R.A. 2005. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 6–13.
12. Penning T.M. 2005. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1687–1690.

13. Szakács G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 219–234.
14. Sheps J.A., Ling V. 2007. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Eur. J. Physiol.* **453**, 545–553.
15. Ying Huanga, Anderle P., Sadéeb W., et al. 2004. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* **64**, 4294–4301.
16. Townsend D.M., Tew K.D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* **22**, 7369–7375.
17. Pommier Y., Sordet O., Antony S., et al. 2004. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene.* **23**, 2934–2949.
18. Herr I., Debatin K. 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* **98**, 2603–2614.
19. Вайшла Н.А., Зиновьева М.В., Сасс А.В., Копанцев Е.П., Виноградова Т.В., Свердлов Е.Д. 2008. Увеличение экспрессии гена *BIRC5* при плоскоклеточном раке легкого и пищевода не коррелирует с экспрессией генов *SMAC/DIABLO* и *PML*, кодирующих его ингибиторы. *Молекуляр. биология.* **42**, 652–661.
20. Scieglińska D., Piętkowski W., Mazurek A., et al. 2008. The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **104**, 2193–2206.
21. Hynes N.E., MacDonald G. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 177–184.
22. Wadham C., Gamble J.R., Vadas M.A., Khew-Goodall Y. 2003. The protein tyrosine phosphatase Pez is a major phosphatase of adherens junctions and dephosphorylates b-catenin. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 2520–2529.
23. Pupa S.M., Giuffrè S., Castiglioni F., et al. 2007. Regulation of breast cancer response to chemotherapy by Fibulin-1. *Cancer Res.* **67**, 4271–4277.
24. Chao-Chi Hoab, Sung-Hsin Kuoc, Pei-Hsin Huangd, et al. 2008. Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. *Lung Cancer.* **59**, 105–110.
25. Goetz J.G., Lajoie P., Wiseman S.M., Nabi I.R. 2008. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev.* **27**, 715–735.
26. Shin-ichi Fukumoto, Naoko Yamauchi, Hisashi Moriguchi, et al. 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1776–1785.
27. Hirotaka Osada, Yoshio Tatematsu, Yasushi Yatabe, et al. 2002. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers. *Oncogene.* **21**, 2418–2424.
28. Cohen S.M., Lippard S.J. 2001. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **67**, 93–130.
29. Zejia Yang, Schumaker L.M., Egorin M.J., et al. 2006. Cisplatin preferentially binds mitochondrial dna and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5817–5825.
30. Martins N.M., Santos N.A., Curti C., et al. 2008. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J. Appl. Toxicol.* **28**, 337–344.
31. Щепеткин И.А., Плотников В.М., Кагия В.Т. 2001. Влияние производных платины на активность микросомных NADPH-оксидоредуктаз. *Вопр. мед. химии.* **47**, 1–5.
32. Derry W.B., Wilson L., Khan I.A., et al. 1997. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry.* **36**, 3554–3562.
33. Bhalla K.N. 2003. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene.* **22**, 9075–9086.
34. Potti A., Dressman H.K., Bild A., et al. 2006. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat. Med.* **12**, 1294–1300.