

Hroniskas vieglas hipoksijas ietekme uz genoma nestabilitāti HER2+ krūts vēža šūnu līnijā SK BR-3

*Valdis Pirsko, Inese Čakstiņa, Dace Bērziņa,
Marta Priedīte, Dina Nitiša, Zanda Daneberga,
Miki Nakazawa-Miklasevica, Edvīns Miklaševičs*

Rīgas Stradiņa universitāte, Onkoloģijas institūts, Latvija

Ievads. Genoma nestabilitāte ir nozīmīgs kancerogēneses faktors. Hromosomu aberāciju pastiprināta veidošanās ir saistīta ar intensīvāku vēža šūnu dalīšanos, vietējas invāzijas un attālu metastāžu risku, kā arī ar rezistenci pret terapiju. Protoonkogēna ERBB2 (*HER-2/neu*) amplifikācija pacientēm ar krūts vēzi ir saistīta ar sliktu prognozi daļēji augstākas genoma nestabilitātes dēļ. Arī audzēja hipoksijas rezultāts var būt saistīts ar agresīvāku slimības norisi un pastiprinātu genoma nestabilitāti, jo hipoksija ietekmē DNS bojājuma atbildes reakcijas un reparācijas mehānismus un veicina agresīvāku vēža šūnu populāciju selekciju.

Darba mērķis, materiāls un metodes. Pētījuma mērķis bija noteikt hroniskas hipoksijas ietekmi uz genoma nestabilitāti HER2+ tipa krūts vēža šūnu līnijā SK-BR-3 (*ATCC®HTB-30*). Genoma nestabilitāte tika raksturota ar mikrokodolu īpatsvaru populācijā, DNS lūzumpunktu skaitu, genoma kopiju skaita izmaiņām (CNV) un ar genoma stabilitāti saistīto gēnu (*BRCA1, FANCD2, CDC25A, RAD17, SMC1, ATM, ATR, CHEK1, CHEK2, H2AFX, TP53*) ekspresiju. Šūnu līnija četrus pārsējumus tika kultivēta vieglā hipoksijā (2,0% O₂; *Biospherix*) un normoksijā (19,5% O₂; kontrole) trīs atkārtojumos. Katrā pārsēšanas reizē šūnu paraugs tika lizēts DNS un RNS izdalīšanai, bet pēc 3. pārsējuma šūnas tika uzsētas arī mikrokodolu analīzei. CNV – analizētas pēc 2. un 3. pārsējuma. Mikrokodolu analīze veikta ar *InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare)* pēc fiksētu un permeabilizētu šūnu citoplazmas iezīmēšanas ar antivielu pret tubulīnu (*ab80779, Abcam*), bet kodolu un mikrokodoliņu iezīmēšanas – ar DAPI. Attēla analīze tika veikta ar *InCell Investigator 1.6.3*. CNV noteiktas ar genotipēšanas mikročipu *Human CytoSNP-12.1 BeadChip (Illumina)*. CNV rezultātu sākotnējā analīze tika veikta ar *GenomeStudio 2.0* programmu. Gēnu ekspresijas izmaiņas noteiktas ar kvantitatīvo PCR (*ViiA 7™; Applied Biosystems*). Visi paraugi analizēti trīs atkārtojumos. Rezultātu statistiskā apstrāde veikta ar *R Core Team* programmu.

Rezultāti. Hroniskas vieglas hipoksijas ietekmē HER2+ krūts vēža šūnu līnijā SK-BR-3 mikrokodolu skaits palielinājās 3,3 reizes, salīdzinot ar normoksiju (attiecīgi 25,38 un 5,86 mikrokodoli uz 1000 šūnām; $p < 0,0001$). Adaptācija vieglai hipoksijai sākotnēji bija saistīta ar genoma kontrakciju un lūzumpunktu skaita samazināšanos (normoksija vs. hipoksija pēc 2. pārsējuma: DNS indekss attiecīgi 2,0644 un 1,8989; lūzumpunktu skaits – attiecīgi 4573 un 2678). Turpmākā hroniskas vieglās hipoksijas ietekmē kopējais DNS daudzums šūnā turpināja samazināties, bet palielinājās lūzumpunktu skaits (hipoksijā pēc 3. pārsējuma – DNS indekss 1,8926, lūzumpunktu skaits – 3037), liecinot par genomiskās heterogenitātes pieaugumu populācijā. Hroniskā vieglā hipoksijā pastiprinājās DNS bojājuma atbildes reakcijas *ATM-CHEK2* signālceļa gēnu un samazinājās DNS dubultpārrāvumu reparācijā iesaistīto gēnu (*H2AFX, BRCA1, FANCD2*) ekspresija.

Secinājumi.

1. Hroniska viegla hipoksija HER2+ krūts vēža šūnu līnijā SK-BR-3 pastiprina genoma nestabilitāti.
2. Sākotnējā adaptācija hroniskai vieglai hipoksijai pētītajā šūnu līnijā ir saistīta ar genoma kontrakciju un ģenētiskās heterogenitātes samazināšanos.
3. Lūzumpunktu skaita izmaiņas liecina, ka pēc sākotnējās to pētītās šūnu līnijas celmu selekcijas – kas izdzīvo un pielāgojas hroniskai vieglai hipoksijai – pastiprinās genoma izmaiņu veidošanās.
4. DNS dubultpārrāvumu reparācijā iesaistīto gēnu ekspresijas samazināšanās liecina par samazinātu DNS reparācijas kapacitāti pētītajā HER2+ šūnu līnijā hroniskā vieglā hipoksijā.

Valsts pētījumu programma "BIOMEDICINE 2014–2017", projekts Nr. 5.5. "Personalizēta vēža diagnostika un terapijas efektivitātes noteikšana".