

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЭКСПРЕССИЯ ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ ПОСЛЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

М.М. Цыганов^{1,2}, М.К. Ибрагимова^{1,2}, Е.М. Слонимская¹,
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Н.В. Литвяков^{1,2}

Томский НИИ онкологии, г. Томск¹

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск²
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: tsyganovmm@yandex.ru¹

Аннотация

В настоящее время практически не изученным остается механизм регуляции экспрессии генов ABC-транспортёров, который связан с индивидуальными особенностями организма опухоленосителя и его опухоли, определяемыми генным однонуклеотидным полиморфизмом (SNP – Single Nucleotide Polymorphism). Проведено изучение ассоциации SNP в широкогеномном масштабе с уровнем экспрессии генов ABC-транспортёров после неоадьювантной химиотерапии (НХТ) у 68 больных с морфологически верифицированным раком молочной железы (РМЖ). При помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени изучена экспрессия 4 генов ABC: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2* в операционном материале после НХТ. Для исследования SNP проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности, которые содержат более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов. В результате биоинформатического анализа было идентифицировано 6 SNP, которые статистически значимо связаны с послеоперационным уровнем экспрессии генов ABC: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2*. Показано, что у носителей редкого генотипа уровень экспрессии всех 4 исследованных генов в опухоли после воздействия химиопрепаратов либо снижен (*rs2680835*, *rs1951366* и *rs12018988*), либо повышен (*rs4676478*, *rs6896596*, *rs1154121*) по сравнению с носителями частого и гетерозиготного генотипов этих SNP. Обсуждены возможные механизмы влияния выявленных SNP и их генов на экспрессию ABC-транспортёров.

Ключевые слова: ABC-транспортёры, рак молочной железы, однонуклеотидный полиморфизм, микроматричное исследование.

Основной причиной неэффективности химиотерапии считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухоли за счет экспрессии энергозависимых белков ABC-транспортёров (*ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*), выбрасывающих лекарственные препараты из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ [9, 11]. Наши предыдущие исследования показали, что эффективность неоадьювантной химиотерапии (НХТ) рака молочной железы (РМЖ) связана не с исходным уровнем экспрессии ABC-транспортёров в опухоли, а с его изменением в процессе лечения. Если в процессе НХТ экспрессия генов ABC в опухоли снижается, то наблюдается клинический ответ на химиотерапию, в противном случае формируется фенотип множественной лекарственной устойчивости, ответ на химиотерапию отсутствует и значительно увеличено отдаленное метастазирование [1–3, 21].

Практически не изученным остается механизм регуляции экспрессии ABC-транспортёров, который

связан с индивидуальными особенностями организма опухоленосителя и его опухоли, определяемыми генным однонуклеотидным полиморфизмом (SNP – Single Nucleotide Polymorphism). Известны только немногие SNP, которые ассоциированы с уровнем экспрессии ABC-транспортёров. Прежде всего, это полиморфизм самих генов ABC, которые имеют значение для экспрессии генов ABC и работы транспортёров: *ABCG2 R482T* или *R482G*, *ABCB1 rs1045642*, *ABCC1 rs35605*, *GSTP1 rs1695*, *ABCG2 rs2725264*, *ABCC2 (rs1885301, rs717620 и rs3740066)* и др. [5, 6, 13–15, 25–27, 29, 30]. По данным ряда авторов, экспрессия генов ABC связана и с отдельными полиморфизмами других генов [7, 9, 32]. Наши предыдущие исследования позволили установить 5 SNP генов репарации, апоптоза и фолатного цикла (*TP53 rs1042522*, *TP53 rs8073498*, *MTHFR rs1801133*, *FGFR2 rs2981582* и *ATM1 rs664143*), которые связаны с регуляцией отдельных генов ABC [4].

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о связи полиморфизма с уровнем экспрессии

генов ABC и их регуляцией и делает актуальными исследования по выявлению генов и полиморфных локусов, участвующих в регуляции экспрессии ABC-транспортеров и формировании лекарственной устойчивости опухоли. Следует отметить, что исследования связи генного полиморфизма с экспрессией генов ABC проводятся в мире в узком формате. В одном исследовании изучаются не более 100 полиморфизмов, что не позволяет в полной мере выявить индивидуальные генетические особенности организма и опухоли, связанные с экспрессией генов ABC-транспортеров. Работы по изучению связи SNP с изменением экспрессии генов ABC в процессе химиотерапии отсутствуют, а, как нами было установлено, именно изменение экспрессии ABC-транспортеров определяет эффективность химиотерапии.

Целью исследования явилось изучение ассоциации SNP опухоли молочной железы в широко-

геномном масштабе с уровнем экспрессии генов ABC-транспортеров после НХТ.

Материал и методы

В исследование включены 68 больных РМЖ ПА–ПИС стадий, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 28–68 лет, в среднем $53,43 \pm 0,78$ года (табл. 1). В соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [28] все больные получали 2–4 курса неoadъювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода) или монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НХТ выполнялась операция, затем проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводи-

Таблица 1

Клинико-патологические параметры обследованных больных РМЖ

Клинико-патологический параметр		Число больных
Возраст (лет)	≤45	21 (30,9 %)
	>45	47 (69,1 %)
Менструальный статус	Пременопауза	36 (52,9 %)
	Постменопауза	32 (47,1 %)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	58 (85,3 %)
	Инвазивный дольковый рак	3 (4,4 %)
	Медулярный рак	2 (2,9 %)
	Другие типы	5 (7,4 %)
Размер опухоли	T ₁	9 (13,2 %)
	T ₂	52 (76,5 %)
	T ₃	3 (4,4 %)
	T ₄	4 (5,9 %)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	27 (39,7 %)
	N ₁	31 (45,6 %)
	N ₂	4 (5,9 %)
	N ₃	6 (8,8 %)
Рецепторы эстрогена	+	33 (48,5 %)
	–	31 (42,6 %)
	Нет данных	4 (5,9 %)
Рецепторы прогестерона	+	35 (51,5 %)
	–	29 (42,26 %)
	Нет данных	4 (5,9 %)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	47 (69,1 %)
	++	10 (14,7 %)
	+++	6 (8,8 %)
	Нет данных	5 (7,4 %)
Молекулярный подтип	Люминальный В	40 (59,7 %)
	Трижды негативный	17 (25,4 %)
	HER2-позитивный	10 (14,9 %)
Гистологическая форма	Уницентрическая	45 (66,2 %)
	Мультицентрическая	23 (33,8 %)
Степень злокачественности	1 степень	2 (2,9 %)
	2 степень	48 (70,6 %)
	3 степень	6 (8,8 %)
	Нет данных	12 (17,6 %)
Схема НАХТ	САХ	21 (30,9 %)
	FAC	33 (48,5 %)
	Таксотер	14 (20,6 %)

лось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (доработанной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета Томского НИИ онкологии. Были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал (~60–70 мм³). Образцы опухоли помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, USA) и сохраняли при температуре –80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения РНК и ДНК.

РНК выделяли из 68 образцов после НХТ с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Качество и целостность РНК оценивались при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Показатель RIN составил 5,6–7,8. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Lithuania) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. Остальные манипуляции, последовательность праймеров и методика оценки относительной экспрессии генов ABC описаны ранее [21]. В качестве результата оценивался уровень экспрессии исследуемых генов ABC: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* относительно гена-рефери *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы, вычисляемый по методу Pfaffl [24] в операционном материале после НХТ.

ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Концентрацию ДНК и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (от 50 до 150 нг/мкл, A260/A280 = 2,10–2,35; A260/A230 = 2,15–2,40). Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA), фрагменты ДНК имели массу более 48 kbp.

SNP в опухоли изучали при помощи микроматричного анализа на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array (<http://www.affymetrix.com/eseach/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>), которые содержат более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу Chromosome Analysis Suite 2.0 (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов матрицы CytoScan™ HD Array. Определение SNP генов по *rs* осуществляли при помощи базы данных Affymetrix (<https://www.affymetrix.com/>). Ассоциацию уровня экспрессии генов ABC после НХТ с SNP в опухоли оценивали

с использованием языка программирования «R» в программе R version 3.0.2. Программа предназначена для статистической обработки большого массива данных и содержит общий пакет статистического анализа. Для биоинформатического анализа специально был прописан скрипт (последовательность команд), содержащий в себе команды форматирования данных и расчета. Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения использовалась поправка Бонферрони.

Результаты исследования и обсуждение

Была проанализирована связь экспрессии генов ABC-транспортеров после НХТ с SNP, которые определялись в опухоли до лечения при помощи микроматриц. Поскольку в предыдущем исследовании наиболее сильная коэкспрессия в процессе НХТ была показана для генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2*, то анализировали связь SNP с экспрессией именно этих четырех генов. Всего в биоинформатический анализ было включено 749 158 SNP на каждого пациента. В процессе анализа происходила фильтрация первичных данных. В первую очередь из представленного массива данных (749 158 SNP) были исключены мономорфные полиморфизмы, которые имели только один (дикий) или два (дикий и гетерозиготный) генотипа. Далее из анализа исключались SNP с частотами генотипов, не соответствующими ожидаемым при соблюдении равновесия Харди – Вайнберга, поскольку в противном случае выборка по SNP оказывается подразделенной и ее нельзя рассматривать как единую выборку. Следующий фильтр был подобран, исходя из выбора в качестве генотипической модели – рецессивной генотипической модели (редкий генотип против гетерозиготного + частого генотипов), которая была определена согласно информационному критерию Акаике. Эмпирически была подобрана необходимость наличия частоты редкого генотипа не менее 8%. Все SNP с частотой редкого генотипа исключались из анализа. В итоге для анализа было оставлено 258 586 SNP. Для этих SNP был произведен расчет уровня статистической значимости различий экспрессии по каждому из четырех генов ABC после НХТ – редкий генотип против гетерозиготного+частого генотипов по логлинейной регрессии. Далее были выбраны общие для генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* SNP. В результате идентифицировано 6 полиморфизмов (*EPHA4* (*rs2680835*), *SCN10A* (*rs4676478*), *H2AFY* (*rs6896596*), *SLC25A21* (*rs1154121*), *RTN1* (*rs1951366*), *RTN1* (*rs12018988*)), связанных с послеоперационным уровнем экспрессии четырех генов ABC (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2*) одновременно (рис. 1).

Экспрессия всех четырех исследованных генов ABC у носителей редкого генотипа полиморфизмов *EPHA4* (*rs2680835*), *RTN1* (*rs1951366*) и *RTN1* (*rs12018988*) после проведения НХТ статистически

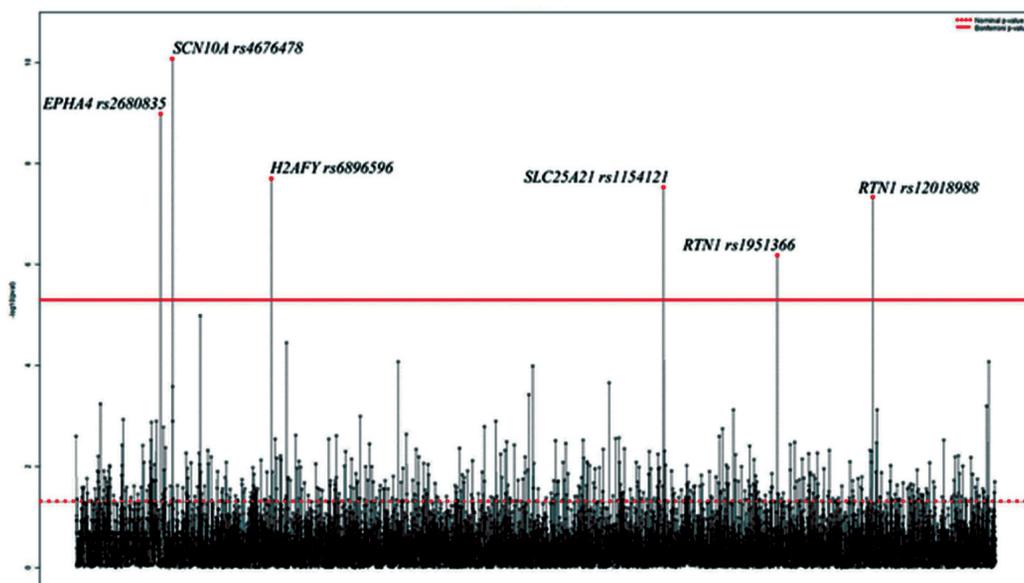


Рис. 1. Уровень статистической значимости связи SNP с экспрессией генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* после НХТ. Примечание: по оси ординат – значение десятичного логарифма уровня статистической значимости (p-level); по оси абсцисс – однонуклеотидные полиморфизмы (n = 258586 SNP). На рисунке пунктирной линией обозначено значение номинального p-level, равного 0,05, сплошной линией – значение p-level с учетом поправки Бонферрони

значимо ниже, чем у носителей гетерозиготного и дикого генотипов (p-level < 0,01 с учетом поправки Бонферрони) (табл. 2). Для полиморфизмов *SCN10A* (rs4676478), *H2AFY* (rs6896596), *SLC25A21* (rs1154121) было показано, что у больных с гетерозиготным и диким генотипом уровень экспрессии после НХТ достоверно ниже по сравнению с редким генотипом, в среднем в 2 раза (p-level < 0,01 с учетом поправки Бонферрони). Таким образом, однонуклеотидный полиморфизм опухолевых клеток может оказывать влияние на уровень экспрессии комплекса генов ABC после воздействия химиопрепаратов.

Механизм, благодаря которому SNP может оказывать влияние на экспрессию генов ABC, еще предстоит выявить. В настоящее время на основании литературных данных можно только высказать некоторые предположения. Функция полиморфизма *EPHA4* (rs2680835), согласно базе данных <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>, неизвестна. По поводу функций гена *EPHA4* имеется некоторая информация. В недавних исследованиях было показано, что целенаправленное ингибирование экспрессии генов группы *EPHA* вызывает устойчивость опухоли молочной железы к трастузумабу [34], но при этом делает опухолевые клетки чувствительными к тамоксифену [10]. Учитывая то, что выведение тамоксифена из опухолевых клеток осуществляется двумя генами лекарственной устойчивости *ABCB1* и *ABCC2* [31], можно предположить, что мутантный генотип *EPHA4* (rs2680835) ингибирует экспрессию этого гена.

Роль гена ретикулонина 1 – *RTN1* – в формировании лекарственной устойчивости или взаимодействии с генами ABC остается неясной. В единичных исследованиях было показано, что продукт гена

RTN1 может взаимодействовать с белком спастина (SPAST) [22], который, в свою очередь, опосредованно влияет на экспрессию белка тубулина, что делает опухолевые клетки чувствительными к воздействию химиопрепаратов [8].

Для полиморфизма *SCN10A* (rs4676478) в базе данных <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/> показана функция регуляции транскрипции. Сам ген *SCN10A* кодирует тетродотоксин-резистентный натриевый канал, локализуется на мембране клетки. В недавней публикации показана роль SNP этого гена в индуцированной химиотерапией гастроинтестинальной токсичности [12], в реализации которой также играют роль и полиморфизмы генов ABC [20].

Согласно базе <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>, полиморфизм гена гистонового белка *H2AFY* (rs6896596) находится в downstream регионе и участвует в регуляции транскрипции гена *H2AFY*, который регулирует *HDAC* (Histone Deacetylase) диацетилазу гистонов (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=H2AFY&keywords=H2AFY>). Также недавно было показано, что *HDAC1* и *2* ингибируют экспрессию генов *ABCB1* и *ABCC2* их продуктов в клеточных культурах colorectal adenocarcinoma и carcinoma [33].

В 2012 г. J. Radoslaw et al. провели микроматричное исследование экспрессии генов ABC-транспортеров и генов семейства транспортеров SLC. Ими была изучена роль данных генов в формировании лекарственной устойчивости к таким химиопрепаратам, как метотрексат, цисплатин, доксорубин, винкристин, топотекан, а также паклитексел – при раке яичника [18]. Оказалось, что высокий уровень экспрессии генов *SLC* связан с устойчивостью опухолевых клеток к метотрек-

Таблица 2

Уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* в опухоли молочной железы после НХТ в зависимости от генотипа по выявленным полиморфизмам в рецессивной модели наследования

SNP	Генотип	Уровень экспрессии после НХТ			
		<i>ABCB1</i>	<i>ABCC1</i>	<i>ABCC2</i>	<i>ABCG2</i>
<i>EPHA4</i> (rs2680835)	<i>TT/TC</i>	4,53 ± 1,34	1,67 ± 0,38	4,26 ± 1,23	2,87 ± 0,58
	<i>CC</i>	3,14 ± 1,02	0,80 ± 0,13	1,32 ± 0,54	1,61 ± 0,60
<i>RTN1</i> (rs1951366)	<i>AA/AG</i>	5,16 ± 1,33	1,790 ± 0,37	4,40 ± 1,21	3,29 ± 0,59
	<i>GG</i>	1,94 ± 0,70	0,59 ± 0,11	1,04 ± 0,42	0,73 ± 0,26
<i>RTN1</i> (rs12018988)	<i>AA/AG</i>	4,88 ± 1,26	1,71 ± 0,35	4,16 ± 1,14	3,14 ± 0,56
	<i>GG</i>	2,00 ± 0,73	0,62 ± 0,16	1,10 ± 0,44	0,67 ± 0,27
<i>SCN10A</i> (rs4676478)	<i>CC/TC</i>	3,99 ± 1,03	1,22 ± 0,22	3,14 ± 0,93	2,28 ± 0,41
	<i>TT</i>	6,26 ± 3,13	3,77 ± 1,91	6,20 ± 2,29	5,11 ± 2,67
<i>H2AFY</i> (rs6896596)	<i>AA/GA</i>	3,93 ± 1,04	1,22 ± 0,22	3,18 ± 0,95	2,31 ± 0,46
	<i>GG</i>	6,69 ± 3,22	3,60 ± 2,02	6,20 ± 2,32	5,06 ± 1,83
<i>SLC25A21</i> (rs1154121)	<i>CC/CT</i>	3,79 ± 1,03	1,20 ± 0,22	3,02 ± 0,95	2,15 ± 0,41
	<i>TT</i>	6,40 ± 2,71	2,96 ± 1,35	5,62 ± 1,84	4,78 ± 1,84

сату, и, в частности, это было показано для гена *SLC19A1*. Низкий уровень экспрессии других генов *SLC* транспортеров обуславливал формирование лекарственной устойчивости опухоли к лекарственным препаратам, субстратам генов ABC [16, 17, 19, 23].

Заключение

В результате проведенного широкогеномного исследования полиморфизмов опухоли молочной железы были идентифицированы 6 SNP, статистически значимо связанных с уровнем экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* после НХТ. Показано, что у носителей редкого генотипа уровень экспрессии всех четырех исследованных генов в

опухоли после воздействия химиопрепаратов либо снижен (*EPHA4* (rs2680835), *RTN1* (rs1951366) и *RTN1* (rs12018988)), либо повышен (*SCN10A* (rs4676478), *H2AFY* (rs6896596), *SLC25A21* (rs1154121)) по сравнению с носителями частого и гетерозиготного генотипов этих SNP. Обсуждены возможные механизмы влияния выявленных SNP и их генов на экспрессию ABC-транспортеров.

Работа поддержана грантом РФФИ № НК 14-04-31633\15 «Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и клональные циклы эволюции опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии» и программой повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвяков Н.В. Регуляция экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 2014. 47 с.
2. Литвяков Н.В. Градиентный феномен экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии: связь с прогрессированием заболевания // Сибирский онкологический журнал, 2013. № 4. С. 5–11.
3. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Христенко К.Ю., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. Связь безметастатической выживаемости больных раком молочной железы и вектора изменения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли при проведении неoadъювантной химиотерапии // Вопросы онкологии. 2013. Т. 59, № 3 (59). С. 334–340.
4. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Мерзлякова М.К., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М. Ассоциация генетического полиморфизма с изменением экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии // Медицинская генетика. 2011. Т. 10, № 10. С. 37–43.
5. Allen J.D., Jackson S.C., Schinkel A.H. A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance // Cancer Res. 2002. Vol. 62 (8). P. 2294–2299.
6. Di Francia R., Siesto R.S., Valente D., Spart D., Berretta M. Pharmacogenomics panel test for prevention toxicity in patient who receive Fluoropyrimidine/Oxaliplatin-based therapy // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2012. Vol. 16 (9). P. 1211–1217.
7. Einert T.R., Schmidt G., Binig G. Diagnostics // Ann. Oncol. 2012. Vol. 23 (Suppl. 5): P. 12–22. doi:10.1093/annonc/mds161.
8. Errico A., Claudiani P., D'Addio M., Rugarli E.I. Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon // Hum. Mol. Genet. 2004. Vol. 13 (18). P. 2121–2132.
9. Gillet J.P., Gottesman M.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1 // Drug Resistance Updates. 2012. Vol. 15 (1–2). P. 2–4. doi: 10.1016/j.drug.2012.03.001.
10. Gökmen-Polar Y., Toroni R.A., Hocevar B.A., Badve S., Zhao Q., Shen C., Bruckheimer E., Kinch M.S., Miller K.D. Dual targeting of EphA2 and ER restores tamoxifen sensitivity in ER/EphA2-positive breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. 2011. Vol. 127 (2). P. 375–384. doi: 10.1007/s10549-010-1004-y.
11. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // Nat. Rev. Cancer. 2002. Vol. 2 (1). P. 48–58.
12. He Y.J., Winham S.J., Hoskins J.M., Glass S., Paul J., Brown R., Motesinger-Reif A., McLeod H.L. Carboplatin/taxane-induced gastrointestinal toxicity: a pharmacogenomics study on the SCOTROC1 trial // Pharmacogenomics J. 2015. doi: 10.1038/tj.2015.52.
13. Henriksen U., Gether U., Litman T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2 // J. Cell Sci. 2005. Vol. 118 (7). P. 1417–1426.
14. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmüller J., Johné A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97 (7). P. 3473–3478.
15. Honjo Y., Hrycyna C.A., Yan Q.W., Medina-Pérez W.Y., Robey R.W., van de Laar A., Litman T., Dean M., Bates S.E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells // Cancer Res. 2001. Vol. 61 (18). P. 6635–6639.

16. Huang Y, Sadée W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells // *Cancer Lett.* 2006. Vol. 239 (2). P. 168–182.

17. Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy // *Cancer Metastasis Rev.* 2007. Vol. 26 (1). P. 183–201.

18. Januchowski R, Zawierucha P, Ruciński M, Andrzejewska M, Wojtowicz K, Nowicki M, Zabel M. Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line // *Biomed. Pharmacother.* 2014. Vol. 68 (4). P. 447–453. doi: 10.1016/j.biopha.2014.02.002.

19. Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines // *Biomed. Res. Int.* 2013. doi: 10.1155/2013/241763.

20. Kim H.S., Kim M.K., Chung H.H., Kim J.W., Park N.H., Song Y.S., Kang S.B. Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study // *Gynecol. Oncol.* 2009. Vol. 113 (2): P. 264–269. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.01.002.

21. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Garbukov E.Y., Merzliakova M.K., Volkomorov V.V., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Perelmuter V.M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013. Vol. 71 (1). P. 153–163. doi: 10.1007/s00280-012-1992-x.

22. Mannan A.U., Boehm J., Sauter S.M., Rauber A., Byrne P.C., Neesen J., Engel W. Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein // *Neurogenetics.* 2006. Vol. 7 (2). P. 93–103.

23. Nakanishi T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy // *Cancer Genomics Proteomics.* 2007. Vol. 4 (3). P. 241–254.

24. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29 (9). P. e45.

25. Polgar O., Ozvegy-Laczka C., Robey R.W., Morisaki K., Okada M., Tamaki A., Koblos G., Elkind N.B., Ward Y., Dean M., Sarkadi B., Bates S.E. Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45 (16): P. 5251–5260.

26. Robey R., Honjo Y., Morisaki K., Nadjem T.A., Runge S., Risbood M., Poruchynsky M.S., Bates S.E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity // *Br. J. Cancer.* 2003. Vol. 89 (10). P. 1971–1978.

27. Sauer G., Brehm G., Schneider S., Nielsch K., Wehrspohn R.B., Choi J., Hofmeister H., Gösele U. Highly ordered monocrystalline silver nanowire arrays // *J. Appl. Phys.* 2002. Vol. 91 (5): P. 3243–3247.

28. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *Cancer.* 2004. Vol. 100 (12). P. 2512–2532.

29. Taheri M., Mahjoubi F., Omranipour R. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients // *Genet. Mol. Res.* 2010. Vol. 9 (1). P. 34–40. doi: 10.4238/vol9-1gmr669.

30. Tamura A., Wakabayashi K., Onishi Y., Takeda M., Ikegami Y., Sawada S., Tsuji M., Matsuda Y., Ishikawa T. Re-evaluation and functional classification of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2 // *Cancer Sci.* 2007. Vol. 98 (2). P. 231–239.

31. Tefi W.A., Mansell S.E., Kim R.B. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1) // *Drug Metab. Dispos.* 2011. Vol. 39 (3). P. 558–562. doi: 10.1124/dmd.110.036160.

32. Vega-Gálvez A., Di Scalab K., Rodríguez K., Lemus-Mondaca R., Mirandaa M., López J., Perez-Wona M. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian) // *Food Chemistry.* 2009. Vol. 117 (4). P. 647–653. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.066.

33. Xu Y., Jiang Z., Yin P., Li Q., Liu J. Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance // *Exp. Cell Res.* 2012. Vol. 318 (3). P. 177–186. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.11.010.

34. Zhuang G., Brantley-Sieders D.M., Vaught D., Yu J., Xie L., Wells S., Jackson D., Muraoka-Cook R., Arteaga C., Chen J. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70 (1). P. 299–308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1845.

Поступила 4.07.15

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цыганов Матвей Михайлович, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 51-46-09. E-mail: TsyganovMM@yandex.ru. SPIN-код: 1253-0240

Ибрагимова Марина Константиновна, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 51-46-09. E-mail: imk1805@yandex.ru. SPIN-код: 2340-1628

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением общей онкологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 41-80-92. E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-код: 7763-6417

Чердынцева Надежда Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 51-25-29. E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 5344-0990

Литвяков Николай Васильевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией онковирусологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 51-46-07. E-mail: nvlitv72@yandex.ru. SPIN-код: 2546-0181

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN BREAST TUMOR AND EXPRESSION OF ABC-TRANSPORTERS AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

M.M. Tsyganov^{1,2}, M.K. Ibragimova^{1,2}, E.M. Slonimskaya¹, N.V. Cherdyntseva^{1,2}, N.V. Litviakov^{1,2}

Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk¹
Tomsk State University, Tomsk²
5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia, e-mail: tsyganovmm@yandex.ru¹

Abstract

The mechanism of regulation of ABC transporter gene expression, which is related to individual characteristics of the tumor-bearing organism and its tumor, defined by gene single nucleotide polymorphisms (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) has not been extensively studied. We conducted large-scale genome studies of

association of SNP with the level of ABC transporter gene expression. The study involved 68 patients with morphologically verified diagnosis of breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy (NAC). Using a quantitative Real-time PCR, the expression of 4 multidrug resistance (MDR) genes (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*) was studied in surgical samples after NAC. Microarray analysis was performed using high density DNA microarrays, which contain more than 750.000 SNPs. Six SNPs significantly associated with postoperative expression levels of multidrug resistance genes, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*, were identified. It was shown that in carriers of a rare genotype, the expression levels of all 4 examined genes in tumors after chemotherapy were either decreased (rs2680835, rs1951366 and rs12018988), or increased (rs4676478, rs6896596, rs1154121) compared to those observed in carriers of frequent and heterozygous genotypes of the SNP. The possible mechanisms of the effect of the identified SNPs and their genes on the expression of ABC transporters were discussed.

Key words: multidrug resistance genes, single nucleotide polymorphism, breast cancer, microarray research.

REFERENCES

1. Litviakov N.V. Reguljacija jekspressii genov mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti v opuholi molochnoj zhelezy pri provedenii neoadjuvantnoj himioterapii. avtoref. dissertacii ... d-ra biol. nauk. Tomsk, 2014. 37 p. [in Russian]
2. Litviakov N.V. Gradient phenomenon of multidrug resistance gene expression in breast cancer during neoadjuvant chemotherapy // Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2013. № 4 (58). P. 5–11. [in Russian]
3. Litviakov N.V., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Vtorushin S.V., Hristenko K.Ju., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V. Correlation of metastasis-free survival in breast cancer patients and an expression vector of multidrug resistance genes in tumor during neoadjuvant chemotherapy // Voprosy onkologii. 2013. Vol. 59 (3). P. 334–340. [in Russian]
4. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Merzlikova M.K., Garbukov E.Y., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M. Influence of gene polymorphism on the expression of the multidrug resistance genes in breast tumor during neoadjuvant chemotherapy // Medicinskaja genetika. 2011. Vol. 10 (10). P. 37–43. [in Russian]
5. Allen J.D., Jackson S.C., Schinkel A.H. A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance // Cancer Res. 2002. Vol. 62 (8). P. 2294–2299.
6. Di Francia R., Siesto R.S., Valente D., Spart D., Berretta M. Pharmacogenomics panel test for prevention toxicity in patient who receive Fluoropyrimidine/Oxaliplatin-based therapy // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2012. Vol. 16 (9). P. 1211–1217.
7. Einert T.R., Schmidt G., Binnig G. Diagnostics // Ann. Oncol. 2012. Vol. 23 (Suppl. 5). P. 12–22. doi:10.1093/annonc/mds161.
8. Errico A., Claudiani P., D'Addio M., Rugarli E.I. Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon // Hum. Mol. Genet. 2004. Vol. 13 (18). P. 2121–2132.
9. Gillet J.P., Gottesman M.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1 // Drug Resistance Updates. 2012. Vol. 15 (1–2). P. 2–4. doi: 10.1016/j.drug.2012.03.001.
10. Gökmen-Polar Y., Toroni R.A., Hocevar B.A., Badve S., Zhao Q., Shen C., Bruckheimer E., Kinch M.S., Miller K.D. Dual targeting of EphA2 and ER restores tamoxifen sensitivity in ER/EphA2-positive breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. 2011. Vol. 127 (2). P. 375–384. doi: 10.1007/s10549-010-1004-y.
11. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // Nat. Rev. Cancer. 2002. Vol. 2 (1). P. 48–58.
12. He Y.J., Winham S.J., Hoskins J.M., Glass S., Paul J., Brown R., Motsinger-Reif A., McLeod H.L. Carboplatin/taxane-induced gastrointestinal toxicity: a pharmacogenomics study on the SCOTROC1 trial // Pharmacogenomics J. 2015. doi: 10.1038/tpj.2015.52.
13. Henriksen U., Gether U., Litman T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2 // J. Cell Sci. 2005. Vol. 118 (7). P. 1417–1426.
14. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmöller J., Johne A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97 (7). P. 3473–3478.
15. Honjo Y., Hrycyna C.A., Yan Q.W., Medina-Pérez W.Y., Robey R.W., van de Laar A., Litman T., Dean M., Bates S.E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells // Cancer Res. 2001. Vol. 61 (18). P. 6635–6639.
16. Huang Y., Sadée W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells // Cancer Lett. 2006. Vol. 239 (2). P. 168–182.
17. Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy // Cancer Metastasis Rev. 2007. Vol. 26 (1). P. 183–201.
18. Januchowski R., Zawierucha P., Ruciński M., Andrzejewska M., Wojtowicz K., Nowicki M., Zabel M. Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line // Biomed. Pharmacother. 2014. Vol. 68 (4). P. 447–453. doi: 10.1016/j.biopha.2014.02.002.
19. Januchowski R., Wojtowicz K., Sujka-Kordowska P., Andrzejewska M., Zabel M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines // Biomed. Res. Int. 2013. doi: 10.1155/2013/241763.
20. Kim H.S., Kim M.K., Chung H.H., Kim J.W., Park N.H., Song Y.S., Kang S.B. Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study // Gynecol. Oncol. 2009. Vol. 113 (2). P. 264–269. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.01.002.
21. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Garbukov E.Y., Merzlikova M.K., Volkomorov V.V., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Perelmutter V.M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response // Cancer Chemother. Pharmacol. 2013. Vol. 71 (1). P. 153–163. doi: 10.1007/s00280-012-1992-x.
22. Mannan A.U., Boehm J., Sauter S.M., Rauber A., Byrne P.C., Neesen J., Engel W. Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein // Neurogenetics. 2006. Vol. 7 (2). P. 93–103.
23. Nakanishi T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy // Cancer Genomics Proteomics. 2007. Vol. 4 (3). P. 241–254.
24. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29 (9). P. e45.
25. Polgar O., Ozvegy-Laczka C., Robey R.W., Morisaki K., Okada M., Tamaki A., Koblos G., Elkind N.B., Ward Y., Dean M., Sarkadi B., Bates S.E. Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization // Biochemistry. 2006. Vol. 45 (16). P. 5251–5260.
26. Robey R., Honjo Y., Morisaki K., Nadjem T.A., Runge S., Risbood M., Poruchynsky M.S., Bates S.E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity // Br. J. Cancer. 2003. Vol. 89 (10). P. 1971–1978.
27. Sauer G., Brehm G., Schneider S., Nielsch K., Wehrspohn R.B., Choi J., Hofmeister H., Gösele U. Highly ordered monocrystalline silver nanowire arrays // J. Appl. Phys. 2002. Vol. 91 (5). P. 3243–3247.
28. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // Cancer. 2004. Vol. 100 (12). P. 2512–2532.
29. Taheri M., Mahjoubi F., Omranipour R. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients // Genet. Mol. Res. 2010. Vol. 9 (1). P. 34–40. doi: 10.4238/vol9-1gmr669.
30. Tamura A., Wakabayashi K., Onishi Y., Takeda M., Ikegami Y., Sawada S., Tsuji M., Matsuda Y., Ishikawa T. Re-evaluation and functional classification of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2 // Cancer Sci. 2007. Vol. 98 (2). P. 231–239.
31. Teft W.A., Mansell S.E., Kim R.B. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1) // Drug Metab. Dispos. 2011. Vol. 39 (3). P. 558–562. doi: 10.1124/dmd.110.036160.

32. Vega-Gálvez A., Di Scalab K., Rodríguez K., Lemus-Mondaca R., Mirandaa M., López J., Perez-Wona M. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian) // *Food Chemistry*. 2009. Vol. 117 (4). P. 647–653. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.066.

33. Xu Y., Jiang Z., Yin P., Li Q., Liu J. Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance // *Exp. Cell Res.* 2012. Vol. 318 (3). P. 177–186. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.11.010.

34. Zhuang G., Brantley-Sieders D.M., Vaught D., Yu J., Xie L., Wells S., Jackson D., Muraoka-Cook R., Arteaga C., Chen J. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70 (1). P. 299–308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1845.

ABOUT THE AUTHORS

Tsyganov Matvey Mikhailovich, junior research fellow, Laboratory of Viral Oncology, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 51-46-09. E-mail: TsyganovMM@yandex.ru. SPIN-code: 1253-0240

Ibragimova Marina Konstantinovna, junior research fellow, Laboratory of Viral Oncology, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 51-46-09. E-mail: imk1805@yandex.ru. SPIN-code: 2340-1628

Slonimskaya Elena Mikhailovna, MD, Professor, Head of General Oncology Department, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 41-80-92. E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417

Cherdyntseva Nadezhda Viktorovna, Professor, Deputy Director for Basic Science, Head of Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 51-53-42. E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 5344-0990

Litviakov Nikolay Vasilyevich, DSc, Head of Laboratory of Viral Oncology, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 51-46-07. E-mail: nvlity72@yandex.ru. SPIN-code: 2546-0181