

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-239

**АНАЛИЗ РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР В ДОРМАНТНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТКАХ****CANDIDATE REFERENCE GENE ANALYSIS FOR NORMALIZATION OF QRT-PCR DATA IN DORMANT CANCER CELLS**

Э. Р. Исхакова, И. И. Суворова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

E. R. Iskhakova, I. I. Suvorova

*Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg*

✉ 1808elina@gmail.com

**Аннотация**

Блокирование киназы mTOR приводит к уменьшению размеров опухолей и к появлению dormantных раковых клеток. Ингибирование mTOR является основой получения dormantных клеток *in vitro*. В данной работе были продемонстрированы внутриклеточные различия между раковыми клетками в норме и в состоянии dormantности при действии AZD8055, а затем оценены 12 генов-кандидатов с целью найти наиболее релевантный референсный ген для нормализации данных количественной ПЦР.

**Abstract**

Blockage of mTOR kinase leads to a decrease in tumor size and to the appearance of dormant cancer cells. Inhibition of mTOR is the basis for obtaining dormant cells *in vitro*. In this study, we demonstrated intracellular differences between normal and dormant cancer cells under the effect of AZD8055, and then evaluated 12 candidate genes to find the most relevant reference gene for normalization of quantitative PCR data.

Клинически подтверждено, что рецидив онкологических заболеваний обуславливается возобновлением активности dormantных раковых клеток — непролиферирующих раковых клеток, которые обратимо останавливаются в фазе клеточного цикла G1/G0 [3]. Dormantные раковые клетки характеризуются супрессией киназы mTOR, а ингибирование mTOR — это способ получения dormantных опухолевых клеток *in vitro* [1, 2]. Прежде чем приступить к изучению их генной экспрессии, необходимо удостовериться в наличии подходящих референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР, так как использование непригодного референсного гена может привести к ошибочной интерпретации данных.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитометрии было выяснено, что после обработки раковых клеток ингибитором mTOR AZD8055 происходит уменьшение размера клетки и ядра (рис. 1).

Далее была оценена их способность формировать сфероиды, что является тестом на злокачественность. При концентрации ингибитора 0,5 мкМ (рис. 2) эффективность образования сфероидов равна 100 %, значит, клетки сохраняют злокачественный потенциал, но единой тенденции к увеличению или уменьшению размера сфероидов со временем нет. При концентрации AZD8055 10 мкМ большинство клеток образуют сфероиды с 100%-й эффективностью, но их размер значительно меньше, чем в контроле (см. рис. 2). Учитывая, что ингибитор в этой концентрации вносит более выраженный эффект в глубину покоя, а клетки остаются жизнеспособными и злокачественными, было решено обрабатывать клетки ингибитором mTOR в концентрации 10 мкМ.

Референсные гены должны характеризоваться минимальной изменчивостью и высоким уровнем экспрессии. Из числа широко используемых референсных генов нами были выбраны 12 генов-кандидатов, которые участвуют в поддержании базовых клеточных функций: синтез белка (*rpl13a*, *rps18*, *rps23*, *ywhaz*, *tbp*, *eif2b1*), формирование цитоскелета (*actb*, *tuba1a*), метаболизм (*gapdh*, *pgk1*, *cyc1*), иммунопрезентация (*b2m*). На основе кПЦР были получены значения Ct генов-кандидатов в клетках опухолевых линий A549, T98G, PA-1 в норме и после обработки AZD8055 в течение 1 недели. Эти гены экспрессируются на высоком уровне, то есть удовлетворяют одному из требований к референсному гену.

Далее была проведена оценка релевантности референсных генов с помощью различных статистических алгоритмов. Сначала для средних значений Ct были рассчитаны значения коэффициента вариации (CV). Однако низкое значение коэффициента вариации может быть вызвано случайным событием, поэтому мы использова-

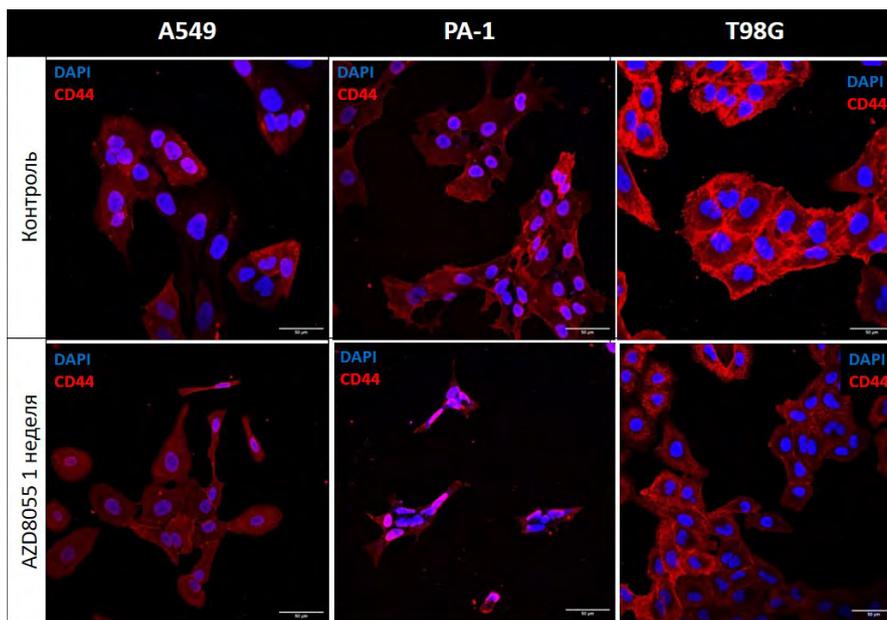


Рис. 1. Окрашивание антителами против CD44 в контрольных и обработанных ингибитором AZD8055 (10 мкМ, 1 неделя) клетках

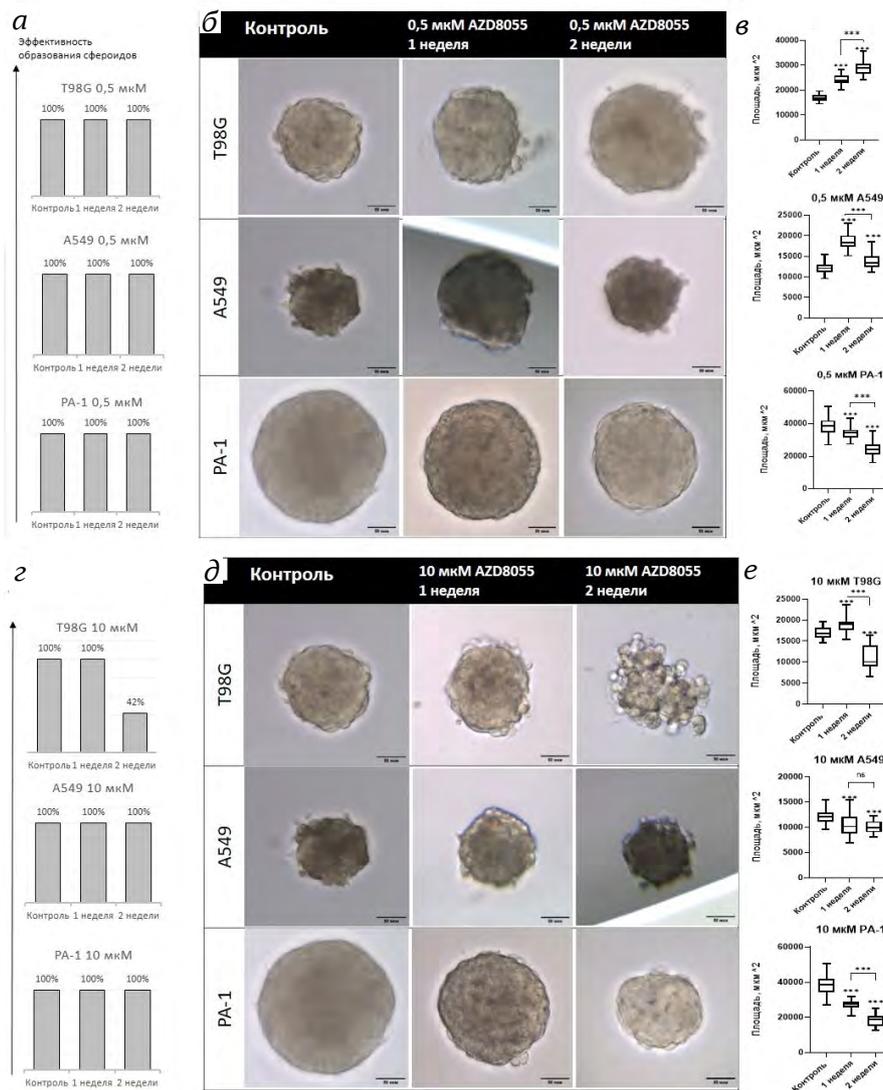


Рис. 2. Влияние ингибитора AZD8055 в концентрации 5 мкМ (а-в) и 10 мкМ (г-е) на злокачественность раковых клеток: а, г — графики эффективности образования; б, д — изображения сфероидов, образованных из клеток линий T98G, A549 и PA-1 под воздействием ингибитора AZD8055; в, е — диаграмма распределения размеров сфероидов

ли и дополнительные статистические алгоритмы. В инструменте NormFinder используется математическая модель, оценивающая внутригрупповую и межгрупповую вариацию пороговых значений цикла, и для каждого гена определяется «значение стабильности» (SV). Программа не позволяет наличие совместно регулируемых генов с высокими значениями корреляции внести ошибки. BestKeeper считает стандартное отклонения значений Ct для каждого гена отдельно, а в сравнительном методе  $\Delta C_t$  значения Ct для каждого гена сравниваются попарно. Программа geNorm определяет попарное стандартное отклонение значений Ct для всех комбинаций генов, а затем исключает ген наименьшей стабильностью.

На основе анализа перечисленными алгоритмами мы разбили референсные гены-кандидаты на три группы в зависимости от стабильности экспрессии. Однозначно можно сказать, что гены *actb*, *rps18*, *rpl13a*, *rps23* являются непригодными референсами, так как они проявили нестабильность экспрессии в результате расчетов во всех трех клеточных линиях. Методом исключения был определен ген, который в рейтингах всех статистических алгоритмов всех клеточных линий всегда занимает высокие места, — *ywhaz*. Он проявляет стабильность экспрессии, следовательно, подходит для нормализации кПЦР в дормантных раковых клетках. Остальные гены были отнесены в группу пригодных, но тканеспецифических референсных генов, которые не рекомендуется использовать в качестве референсов без предварительной проверки на конкретной опухолевой линии.

### Литература

1. Aguirre-Ghiso J.A. Translating the Science of Cancer Dormancy to the Clinic // Cancer Research. 2021. Vol. 18 (81). P. 4673–4675.
2. Aleksandrova K. V., Vorobev M. L., Suvorova I. I. mTOR pathway occupies a central role in the emergence of latent cancer cells // Cell Death & Disease. 2024. Vol. 2 (15). P. 1–11.
3. Naumov G.N. et al. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases // Breast Cancer Research and Treatment. 2003. Vol. 3 (82). P. 199–206.