

## PROAPOPTOZINIO GENO *APAF-1* RAIŠKOS SUMAŽĖJIMAS KASOS VĖŽIO AUDINYJE

Albertas Daukša<sup>1</sup>, Aldona Jakštaitė<sup>1</sup>, Augustina Gasianec<sup>2</sup>, Žilvinas Dambrauskas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Virškinimo sistemos tyrimų institutas,

<sup>2</sup>Vytauto Didžiojo universitetas

**Raktažodžiai:** kasos vėžys, iRNR, *APAF-1*.

### Santrauka

Kasos vėžys - vienas iš blogiausių prognozę turinčių virškinimo organų piktybinių navikų. Vienas svarbiausių baltymų apoptozės mechanizme yra apoptozės proteazės aktyvinantis veiksnys *APAF-1*. Duomenų apie *APAF-1* geno raišką ir jos reikšmę kasos vėžio atveju nėra. Šio darbo tikslas nustatyti *APAF-1* geno raišką kasos vėžiniame audinyje ir jį supančiame sveikame audinyje bei susieti su klinikinėmis ir morfologinėmis ligos ypatybėmis. *APAF-1* geno raiškos tyrimas atliktas realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu iRNR lygmenyje. Tyrime dalyvavo 29 pacientai. Nustatyta, kad *APAF-1* geno raiška navikiniame audinyje sumažėjusi 82,8 proc. (n=24) atvejų. *APAF-1* geno raiška reikšmingai (p= 0,02) skyrėsi tarp navikinio ir sveiko audinio. Sąsajų su klinikinėmis ir morfologinėmis kasos vėžio ypatybėmis nenustatyta. Šiuo tyrimu mes parodėme, kad proapoptozinio geno *APAF-1* raiška kinta kasos vėžio atveju ir gali būti susijusi su šios ligos patogeneze.

### Įvadas

Kasos vėžys – blogiausių prognozę turintis virškinimo organų piktybinis navikas. Jis užima 7-ą vietą tarp vyrų ir moterų mirčių pasaulyje, susijusių su piktybiniais navikais [1]. Penkerių metų išgyvenamumas po radikalaus chirurginio gydymo siekia vos 17–20 proc., tuo tarpu 5-erių metų išgyvenamumas esant pažengusiai ligos formai yra apie 2 proc. 2008 metų GLOBOCAN duomenimis, bendras penkerių metų išgyvenamumas, sergant kasos vėžiu, pasaulyje nesiekia 1 proc. Mirtingumas nuo šios ligos taip pat išlieka vienas didžiausių tarp virškinimo organų navikų [2]. Asmenų, sergančių kasos vėžiu, bendras vienerių metų išgyvenamumas siekia 23,7 proc., tačiau dramatiškai sumažėja per sekančius ketverius metus ir tesiekia 6,3 proc.

Trumpas išgyvenamumas dažniausiai siejamas su ligos išplitimo laipsniu diagnozės nustatymo metu, nes apie 80 proc. atvejų kasos vėžys būna išplitęs lokaliai arba jau yra atokiosios metastazės. Trumpas kasos vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumas skatina ieškoti naujų efektyvių diagnostikos ir gydymo metodų.

Apoptozė arba programuota ląstelių mirtis yra fiziologinis genetiškai reguliuojamas ląstelių žūties mechanizmas, būtinas audinių homeostazei palaikyti. Vienas svarbiausių baltymų apoptozės mechanizme yra apoptozės proteazės aktyvinantis veiksnys *APAF-1*, kuris dalyvauja reguliuojant ląstelių žūtį per vidinį apoptozės mechanizmą, susijusį su mitochondrijomis [3]. *APAF-1* baltymas - neaktyvus ir uždaroje konformacijoje būna tol, kol neatsiranda apoptozės signalas, t.y. ląstelės stresiniai veiksniai (DNR pažeidimai, onkogenų aktyvacija ir kt.) [4]. Atsipalaidavęs citochromas C iš mitochondrijų ir dalyvaujant dATP/ATP sukelia *APAF-1* molekulių oligomerinio komplekso susidarymą. Septynios *APAF-1* molekulių suformuoja apoptosomą, kuri jungiasi su prokaspaze-9 ir ją aktyvuoja, paleidžiant tolimesnę kaspazių aktyvavimo kaskadą, kuri pasibaigia ląstelės apoptoze [5]. Pažeistos apoptosomos susidarymo mechanizme siejamos su vėžio vystymusi ir atsparumu chemoterapiniam gydymui [6]. *APAF-1* inaktyvavimas gali būti svarbi vidinio apoptozės kelio blokavimo priežastis, kuri buvo stebima keletos lokalizacijų navikuose.

Duomenų mokslinėje literatūroje apie *APAF-1* geno raiškos tyrimus, kasos vėžio atveju, nėra.

**Mūsų tyrimo tikslas** - įvertinti *APAF-1* geno raišką pacientų, sergančių kasos vėžiu, navikiniame audinyje ir jį supančiame santykinai sveikame audinyje, bei susieti šiuos pokyčius su klinikinėmis ir morfologinėmis kasos vėžio ypatybėmis.

### Tyrimo medžiaga ir metodas

Tiriamąjį kontingentą sudarė pacientai, kuriems 2012–2014 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikose (LSMU KK) buvo diagnozuotas kasos vė-

žys ir atlikta kasos rezekcinio tipo operacija sutikus dalyvauti tyrime, atlikti pašalinto navikinio ir jį supančio sveiko audinio *APAF-1* geno raiškos tyrimai. Vėžio diagnozė visiems pacientams patvirtinta histologinio tyrimo metu. Prieš planuojamą vėžio operacinį gydymą nei vienam pacientui nebuvo taikyta chemoterapija ar spindulinis gydymas bei abiejų kombinacija. Tyrimui atlikti gautas Kauno regioninio biomedicininiių tyrimų etikos komiteto leidimas BE-2-17.

*APAF-1* geno raiškos tyrimas atliktas iRNR lygmenyje naudojant realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos (RT-PGR) metodą. Audinių mėginiai paimti iškart atlikus kasos rezekcinio tipo operaciją ir užšaldyti skystame azote iki tyrimo  $-80^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. RNR išskyrimui naudotas rinkinys „Direct-zol RNA MiniPrep Kit“ (Zymo Research, JAV), pagal gamintojo rekomendacijas, t.y. iš 25 mg navikinio audinio ir 25 mg naviką supančio sveiko audinio. cDNR sintezei atlikti naudotas rinkinys „High Capacity RNA-to cDNA Kit“ (Applied Biosystems, JAV) vadovaujantis gamintojo protokolu, naudojant 1  $\mu\text{g}$  išskirtos RNR.

RT-PGR tyrimui naudotas mišinys: 2  $\mu\text{l}$  cDNR, 7  $\mu\text{l}$  RNA'se free vanduo (Thermo Scientific, Lietuva), 10  $\mu\text{l}$  „TaqMan Universal PCR Master Mix“ mišinys (Applied Biosystems, JAV), 1  $\mu\text{l}$  20x *APAF-1* TaqMan gen Expression Assay Mix (Applied Biosystems, JAV). Prieš atliekant RT-PGR tiriamasis mišinys supilstytas po 20  $\mu\text{l}$  į 96

**1 lentelė.** Tirtų asmenų (n=29) kasos vėžio klinikinės ir morfologinės charakteristikos.

Požymis	Kasos vėžys	
	n	%
Amžiaus grupės	<65	11 37,9
	$\geq 65$	18 62,1
Lytis	moterys	16 55,2
	vyrų	13 44,8
pT kategorija	pT1+pT2	8 27,6
	pT3+pT4	21 72,4
Metastazės limfmazgiuose	neigiama	9 31
	teigiama	20 69
Navikinė invazija į kraujagysles	neigiama	9 31
	teigiama	20 69
Navikinė invazija į limfagysles	neigiama	8 27,6
	teigiama	21 72,4
Perineurinis naviko plitimas	neigiama	10 34,5
	teigiama	19 65,5
Ląstelių diferenciacijos laipsnis	G1+G2	8 27,6
	G3	21 72,4

šulinėlių plokšteles. RT-PGR tyrimui naudota pradmenų porų rinkinys: *APAF-1* TaqMan, identifikacijos numeris Hs00559441\_m (Life Technologies, JAV), *ACTB* ( $\beta$ -aktinas) TaqMan, identifikacijos numeris Hs01060665\_g1 (Life Technologies, JAV). Termociklerio sąlygos buvo nustatytos taip: 1) uracilo N glikozilazės aktyvacija  $50^{\circ}\text{C}$  - 2 min.; 2) iniciacija  $95^{\circ}\text{C}$  - 10 min.; 3) denatūracija  $95^{\circ}\text{C}$  - 15 sek.; 4) DNR pradmenų prilydymas- grandinės elongacija  $60^{\circ}\text{C}$  - 1min. C ir D žingsniai kartojami 40 kartų (ciklą). RT-PGR atliktas naudojant *ABI 7500 fast* (Applied Biosystems, JAV) termociklerį. *APAF-1* geno raiška, lyginant su vidiniu standartu  $\beta$ -aktinu, kurio raiška nekinta įvairiuose audiniuose, nustatyta Livak metodu pagal  $C_T$  slekstinę fluorescencijos vertę, kai ji pereina iš nekintančios į eksponentinę fazę [7].  $C_T$  vertė nustatoma RT-PGR metu stebint fluorescencijos signalo kitimą, kuris priklauso nuo susidarančio produkto (*APAF-1* ar  $\beta$  aktino) kiekio. Reikšmės apskaičiuotos remiantis trijų eksperimentų vidurkiu. Santykinės *APAF-1* geno raiškos vertės ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) apskaičiuotos keliais etapais: 1) normalizuojamos navikinio ir jį supančio sveiko audinio  $C_T$  vertės-  $\Delta C_{T(\text{navikinio})} = C_{T(\text{APAF-1})} - C_{T(\beta \text{ aktino})}$ ;  $\Delta C_{T(\text{sveiko audinio})} = C_{T(\text{APAF-1})} - C_{T(\beta \text{ aktino})}$ ; 2) normalizuojama  $\Delta C_{T(\text{navikinio})}$  vertė -  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{navikinio})} - \Delta C_{T(\text{sveiko audinio})}$ ; 3) apskaičiuojama *APAF-1* raiška -  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

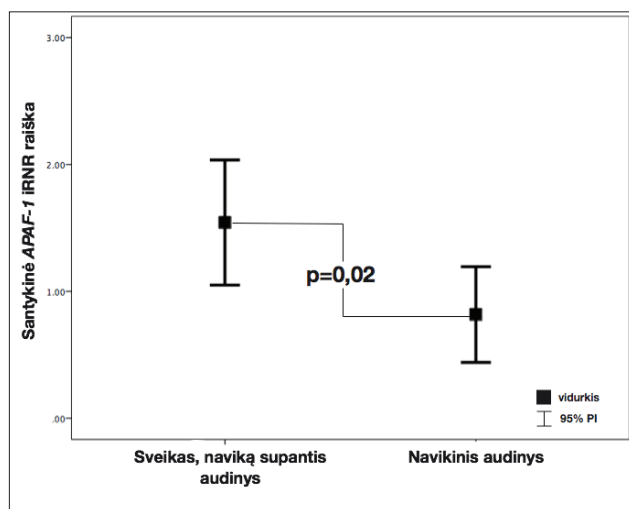
Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis SPSS v. 17.0.0 (Chicago, Illinois, JAV). Apskaičiuotos kintamųjų procentinės reikšmės, aritmetiniai vidurkiai, standartinis nuokrypis (SN). Kadangi kintamieji tenkino normalines skirstinio prielaidas, skirtumams tarp dviejų nepriklausomų grupių nustatyti taikytas Stjudent'o t-testas. Ryšys tarp dviejų kokybinių dydžių vertintas naudojant chi kvadrato ( $\chi^2$ ) kriterijų. Klaidos tikimybė  $p < 0,05$  laikyta ribine statistiniam reikšmingumui įvertinti.

## Rezultatai

Tyrime dalyvavo dvidešimt devyni kasos vėžiu sergantys pacientai. Amžiaus vidurkis  $64,3 \pm 14,8$ . Tiriamąją grupę sudarė 16 moterų ir 13 vyrų. Kasos vėžio klinikinės ir morfologinės charakteristikos vertintos pagal UICC (angl. Union of International Cancer Control) 2009 metų klasifikaciją (1 lentelė).

Pagal RT-PGR metu gautus duomenis, apskaičiuojame santykinę *APAF-1* geno raišką iRNR lygmenyje, naudojant vidinį standartą  $\beta$ -aktiną to paties paciento navikiniame ir jį supančiame sveikame audinyje. Nustatėme, kad *APAF-1* vidutinė raiška ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,81 \pm 0,99$  navikiname audinyje reikšmingai ( $p=0,02$ ) mažesnė nei jį supančiame sveikame audinyje ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 1,54 \pm 1,29$ ) (1 pav.).

Vertindami *APAF-1* geno raišką to paties paciento audiniuose, nustatėme, kad 82,8 proc. atveju *APAF-1* raiška



**1 paveikslas.** Santykinė APAF-1 iRNR raiška ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) apskaičiuota realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metu lyginant su vidiniu standartu  $\beta$ -aktinu ( $p$  reikšmė apskaičiuota naudojant  $t$ -testą; PI - pasikliautinis intervalas)

navikiniame audinyje yra mažesnė nei sveikame audinyje. Šis pokytis varijuoja ir skiriasi iki daugiau nei 5 kartų. Tokiu būdu *APAF-1* geno raiška 41,3 proc. ( $n=13$ ) pacientų daugiau nei 2 kartus buvo mažesnė navikiniame audinyje. 17,2 proc. ( $n=5$ ) atvejų *APAF-1* geno raiška buvo panaši sveikame ir navikiniame audinyje ar neženkliai didesnė navikiniame audinyje.

### Rezultatų aptarimas

Šiame tyrime nagrinėjome *APAF-1* geno raišką, kad nustatytume, ar šie pokyčiai gali būti siejami su kasos vėžiu. *APAF-1* geno raiška buvo vertinta iRNR lygmenyje, kadangi tyrimais įrodyta teigiama koreliacija tarp *APAF-1* iRNR ir baltymo kiekio audinyje [8]. Mūsų tyrimas parodė reikšmingus *APAF-1* geno raiškos skirtumus tarp navikinio audinio ir jį supančio sveiko audinio. Tai rodo, kad *APAF-1* inaktyvavimas gali būti svarbi vidinio apoptozės kelio blokavimo priežastis kasos vėžio atveju. Iki šiol atlikta nedaug tyrimų nagrinėjant *APAF-1* geno raišką skirtingų lokalizacijų navikuose, kurių rezultatai sutampa su mūsų tyrimo duomenimis [9–14]. Tyrimų, kuriuose būtų nagrinėjama *APAF-1* geno raiška kasos vėžio atveju, iki šiol nėra.

Mūsų tyrimais nebuvo nustatyta reikšmingų sąsajų su klinikinėmis ir morfologinėmis kasos vėžio ypatybėmis. Tai galėjo būti įtakota santykinai nedideliu tirtų atvejų skaičiumi, kuris neleido mums nustatyti minėtų pokyčių. Visgi kitų mokslininkų tyrimai parodė, kad *APAF-1* geno raiška gali būti siejama su klinikinėmis ir morfologinėmis vėžio

savybėmis ir jo progresavimu. Buvo nustatyta atvirkštinė koreliacija tarp *APAF-1* raiškos ir ligos stadijos [15–17]. Baldi su bendraautoriais nustatė, kad *APAF-1* raiška reikšmingai sumažėja esant melanomai su metastazėmis nei melanomoms be metastazių. Tame pačiame tyrime autoriai nustatė, kad *APAF-1* raiška reikšmingai skiriasi tarp melanomos ir gerybinių apgamų atvejų, t.y. sumažėja esant melanomai. Panašūs pakitimai buvo nustatyti gimdos kaklelio vėžio atveju, kai *APAF-1* raiška reikšmingai buvo mažesnė navikuose esant naviko metastazėms limfmazgiuose [11]. Visi šie tyrimai rodo neginčijamas *APAF-1* raiškos pokyčių sąsajas su navikinių ligų progresavimu. Blogesnę ligos eigą gali lemti kiti mediatoriai, reguliuojantys su mitochondrijomis susijusią apoptozę, įskaitant *BCL-2*, *p53*, kaspazės ir apoptozės baltymų inhibitorius, kadangi jie moduluoja radioterapijos ir chemoterapijai vartojamų vaistų poveikį [6,18]. Tyrimuose, kuriuose buvo vertinta *APAF-1* raiškos įtaka gydymo efektyvumui, nustatyta, kad mažesnė *APAF-1* raiška taip pat gali būti susijusi su atsparumu radioterapijai ir chemoterapijai bei lemti blogesnę navikinės ligos prognozę [19,20]. Tai galėjo būti įtakota santykinai nedideliu tirtų pacientų skaičiumi, kuris neleido mums nustatyti minėtų pokyčių.

Mūsų atliktame tyrime nustatėme, kad atskirais atvejais *APAF-1* raiška tarp sveiko ir navikinio audinio gali skirtis kelis kartus ar būti panašiam lygmenyje. Tai gali būti susiję su šio geno reguliacijos mechanizmais, kurie skiriasi individualiais atvejais. Yra žinomi keli *APAF-1* geno raiškos reguliavimo mechanizmai. Vienas iš jų susijęs su geno transkripcijos reguliavimu. *p53* ir *E2F1* - veiksniai susiję su apoptozės indukcija [21]. *p53* atpažįsta ir prisijungia prie *APAF-1* geno promotoriaus regiono. Šią sąveiką sustiprina transkripcijos faktorius *Zac-1*, kuris slopina G1 ląstelių ciklą. *E2F1* skatina apoptozę tiesiogiai aktyvuodamas *APAF-1* geno raišką. Nustatyta, kad *APAF-1* geno raiška gali būti reguliuojama epigenetiniu mechanizmu, t.y. *APAF-1* geno promotoriaus metilinimas slopina pastarojo geno raišką ir tuo pačiu apoptozę. *APAF-1* geno epigenetinis reguliavimo mechanizmas ištirtas nepakankamai, o duomenys mokslinėje literatūroje yra prieštaringi [9,12,22]. Todėl tolimesnis mūsų mokslinės grupės darbas tęsiamas sutelkiant pastangas į epigenetinio *APAF-1* geno reguliacijos mechanizmo išaiškinimą kasos vėžio atveju.

### Išvados

Proapoptozinio *APAF-1* geno raiškos sumažėjimas būdingas reiškinys kasos vėžio atveju. Reikalingi didesnės apimties tyrimai, įvertinantys klinikinę ir prognozinę *APAF-1* geno raiškos sumažėjimo vertę bei funkciniai tyrimai, įvertinantys *APAF-1* geno reguliacijos mechanizmus

Padėka

*Mokslinis tyrimas finansuojamas Europos socialinio fondo lėšomis pagal visuotinės dotacijos priemonę.*

### Literatūra

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:277–300.
- Ashraf QM, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Mechanisms of expression of apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) in nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions of the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurosci Lett* 2007; 415:253–8.
- Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007;14:56–65.
- Reubold TF, Wohlgenuth S, Eschenburg S. A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating apoptosome. *J Biol Chem* 2009; 284:32717–24.
- Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 2005; 1551–60.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006; 7:85.
- Sturm I, Bosanquet AG, Radetzki S, Hummel M, Dörken B, Daniel PT. Silencing of APAF-1 in B-CLL results in poor prognosis in the case of concomitant p53 mutation. *Int J Cancer* 2006;118:2329–36.
- Ashur-Fabian O, Adamsky K, Trakhtenbrot L, Cohen Y, Raanani P, Hardan I. et al. APAF-1 in chronic myelogenous leukemia (CML) progression: Reduced APAF-1 expression is correlated with a H179R p53 mutation during clinical blast crisis. *Cell Cycle* 2007; 6:589–94.
- Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M. APAF-1 signaling in human melanoma. *Cancer Letters* 2006; 168–79.
- Leo C, Richter C, Horn LC, Schütz A, Pilch H, Höckel M. Expression of APAF-1 in cervical cancer correlates with lymph node metastasis but not with intratumoral hypoxia. *Gynecol Oncol* 2005; 97:602–6.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector APAF-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409:207–11.
- Sträter J, Herter I, Merkel G, Hinz U, Weitz J, Möller P. Expression and prognostic significance of APAF-1, caspase-8 and caspase-9 in stage II/III colon carcinoma: Caspase-8 and caspase-9 is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 2010; 127:873–80.
- Zlobec I, Minoo P, Baker K, Haegert D, Khetani K, Tornillo L, et al. Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43:1101–7.
- Baldi A, Santini D, Russo P, Catricalà C, Amantea A, Picardo M, et al. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp Dermatol* 2004; 13:93–7.
- Mustika R, Budiayanto A, Nishigori C, Ichihashi M, Ueda M. Decreased expression of APAF-1 with progression of melanoma. *Pigment Cell Res* 2005; 18:59–62.
- Dai DL, Martinka M, Bush JA, Li G. Reduced APAF-1 expression in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 2004; 91:1089–95.
- Nguyen JT, Wells JA. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7533–8.
- Fujimoto A, Takeuchi H, Taback B, Hsueh EC, Elashoff D, Morton DL, et al. Allelic Imbalance of 12q22-23 Associated with APAF-1 Locus Correlates with Poor Disease Outcome in Cutaneous Melanoma. *Cancer Res* 2004; 64:2245–50.
- Umetani N, Fujimoto A, Takeuchi H, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DSB. Allelic imbalance of APAF-1 locus at 12q23 is related to progression of colorectal carcinoma. *Oncogene* 2004; 23:8292–300.
- De Zio D, Bordi M, Tino E, Lanzuolo C, Ferraro E, Mora E, et al. The DNA repair complex Ku70/86 modulates Apaf1 expression upon DNA damage. *Cell Death Differ* 2011; 18:516–27.
- Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, Nishimura M, Saito Y, Ishii H, et al. Methylation silencing of the APAF-1 gene in acute leukemia. *Mol Cancer Res* 2005; 3:325–34.

### LOSS OF PROAPOPTOTIC GENE *APAF-1* EXPRESSION IN PANCREATIC CANCER

**A. Daukša, A. Jakštaitė, A. Gasianec, Ž. Dambrauskas**

Key words: Pancreatic cancer, mRNA, APAF-1.

Summary

Pancreatic cancer has one of the worst prognoses of all gastrointestinal malignancies. One of the key proteins in the mechanism of apoptosis is apoptosis protease-activating factor *APAF-1*. The aim of this study was to determine expression of *APAF-1* mRNA in pancreatic cancer. Real time PCR for *APAF-1* mRNA was performed on 29 pancreatic cancer cases. The association of *APAF-1* mRNA expression with clinico-pathological features was analysed. *APAF-1* mRNA expression was lower in 82.8 % in pancreatic cancer than in healthy tissues. The difference was found statistically significant ( $p=0.02$ ). No association was found between APAF-1 mRNA expression in cancerous tissues and clinico-pathological features. To conclude, in this study we have demonstrated mRNA decrease of *APAF-1*, indicating that gene involved in cellular apoptosis might be involved in pancreatic cancer pathogenesis.

Correspondence to: albertas.dauksa@gmail.com

Gauta 2014-12-22