

Вариабельность генетического дисбаланса по хромосоме 1 в некультивированных клетках миом матки

Кольцова А.С.^{1*}, Малышева О.В.¹, Пендина А.А.¹, Ефимова О.А.¹, Каминская А.Н.²,
Осиновская Н.С.¹, Султанов И.Ю.¹, Швед Н.Ю.¹, Тихонов А.В.¹, Баранов В.С.¹

¹ — Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург;

* rosenrot15@yandex.ru

² — Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург

Актуальность. Изучение генетического дисбаланса в клетках узлов миомы матки важно для понимания патогенеза заболевания. **Цель:** Изучить спектр изменений в структуре хромосомы 1 и частоты их встречаемости в некультивированных клетках узлов миомы матки с учетом наличия/отсутствия мутаций в гене *MED12*. **Материал и методы.** Исследование проведено на образцах 4 миоматозных узлов крупного размера ($d = 7-20$ см). Спектр изменений в структуре хромосомы 1 определен методом aCGH. Частота встречаемости клеток с изменениями хромосомы 1 определена методом FISH с использованием ДНК-зондов, специфичных к локусам 1pTEL, 1p36, 1q25. Наличие мутаций в экзоне 2 гена *MED12* и в прилегающих интронных последовательностях проанализировано методом секвенирования по Сэнджеру. **Результаты.** Генетический дисбаланс хромосомы 1 выявлен во всех изученных образцах миом. Мутаций в гене *MED12* не выявлено ни в одном из образцов. Спектр выявленных аномалий хромосомы 1, включающий делеции и дупликации, сходен между разными опухолями, однако представленность субпопуляций клеток с различными аномалиями характеризуется вариабельностью. Во всех миомах клетки с аномалиями были представлены минорными, а клетки с двумя копиями хромосомы 1 — мажорными субпопуляциями. **Выводы.** Генетический дисбаланс хромосомы 1 специфичен для клеток миом матки. Выявленные аномалии, вероятно, не являются триггерами возникновения миомы, однако могут быть значимы для опухолевого роста.

Ключевые слова: миома матки, генетический дисбаланс по хромосоме 1, субпопуляции клеток, aCGH, FISH, мутации гена *MED12*

Variation of chromosome 1 genetic imbalance in non-cultured uterine leiomyoma cells

Koltsova A.S.^{1*}, Malysheva O.V.¹, Pendina A.A.¹, Efimova O.A.¹, Kaminskaya A.N.²,
Osionovskaya N.S.¹, Sultanov I.Yu.¹, Shved N.Yu.¹, Tikhonov A.V.¹, Baranov V.S.¹

¹ — D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia; * rosenrot15@yandex.ru

² — Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, St. Petersburg, Russia

Introduction: The study of genetic imbalance in uterine leiomyoma cells is important for understanding of the disease pathogenesis. **Purpose:** To study the spectrum of chromosome 1 aberrations and their frequency in non-cultured uterine leiomyoma cells depending on the presence or absence of *MED12* mutations. **Materials and Methods:** The study was performed on 4 samples from large uterine leiomyomas ($d = 7-20$ cm). The spectrum of chromosome 1 aberrations was revealed by aCGH. The frequency of cells containing chromosome 1 aberrations was determined by FISH using DNA probes for 1pTEL, 1p36, 1q25. The detection of *MED12* mutations in exon 2 and adjacent introns was performed by PCR-direct sequencing. **Results:** The chromosome 1 genetic imbalance was detected in all studied samples. No *MED12* mutations were revealed in either sample. The spectrum of chromosome 1 aberrations included both deletions and duplications and was similar in all tumors. However, the cell subpopulations with different aberrations were present to different degrees among samples. In all uterine leiomyomas, cells with chromosome 1 aberrations were present by minor subpopulations, whereas cells with two copies of chromosome 1 represented major subpopulations. **Conclusions:** Chromosome 1 genetic imbalance is typical for uterine leiomyoma. The detected aberrations, most likely, are not leiomyoma triggers, but may have significance for tumor growth.

Key words: uterine leiomyoma, chromosome 1 genetic imbalance, cell subpopulations, aCGH, FISH, *MED12* mutations

Введение

Миома матки — доброкачественная опухоль миометриального происхождения. У женщин репродуктивного возраста частота возникновения миом достигает 75% [1]. Важную роль в возникновении и развитии заболевания играют как генные, так и хромосомные нарушения [2—4].

При кариотипировании клеточных культур в группе миом были обнаружены делеции короткого плеча хромосомы 1 (1p11-12→1pter) и предположено, что они ассоциированы с высоким риском малигнизации [5]. Для нивелирования воздействия условий культивирования, которые могут вызвать изменение соотношения нормальных и аномальных клеточных клонов, вплоть до ис-

чезновения последних, в настоящем исследовании проведен анализ аберраций хромосомы 1 в некультивированных клетках миом.

Целью настоящего исследования был анализ спектра изменений в структуре хромосомы 1 и частоты их встречаемости в клетках некультивированных образцов миом матки.

Материал и методы

Материалом исследования послужили образцы 4 крупных миоматозных узлов матки ($d = 7\text{--}20\text{ см}$), полученные путем миомэктомии/гистерэктомии от 4 пациенток в НИИ АГиР им. Д.О.Отта.

Спектр изменений в структуре хромосомы 1 в образцах миом изучали методом сравнительной геномной гибридизации aCGH на микроматрицах CytoChip V4.0 и анализировали с помощью программного обеспечения OneClickCGH (PerkinElmer, США). Частоту встречаемости клеток с изменениями хромосомы 1 изучали на фиксированных препаратах интерфазных ядер из некультивированных клеток миом [6] методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с ДНК-зондами, специфичными к трем участкам хромосомы 1: 1pTEL (Vysis 1pTEL SpectrumGreen), 1p36 (Vysis LSI P58 SpectrumOrange), 1q25 (Vysis LSI 1q25 SpectrumAqua) (Abbott Molecular, США).

Наличие мутаций в экзоне 2 и прилегающих интронных последовательностях гена *MED12* анализировали методом полимеразной цепной реакции (праймеры med12F: 5'-GCCCAGCTTTAAGTAACGATCT-3' и med12R: 5'-AGAAAAGTGTACCTCAGGGTGG-3') и последующего секвенирования с использованием Big-Dye Terminator v.3.1 Kit на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) [7].

Исследование проведено на основании информированного согласия пациенток и одобрено этическим комитетом НИИ АГиР им. Д.О. Отта.

Результаты

Первым этапом исследования было изучение спектра изменений в структуре хромосомы 1 в образцах миоматозных узлов методом aCGH. В трех из четырех образцов выявлен генетический дисбаланс хромосомы 1: в образце № 1 — непротяженная интерстициальная делеция 1q31.2 и субтеломерная делеция в сочетании с дупликацией в локусе 1p36.33, в образце № 2 — делеции в локусах 1q42.12-qtel и 1p36.3 в сочетании с протяженной дупликацией 1q21.1-q41, в образце № 3 — множественные хаотические делеции, в том числе в локусе 1p36-1pTEL, и дупликации (рис. 1). В образце № 4 генетического дисбаланса хромосомы 1 не выявлено.

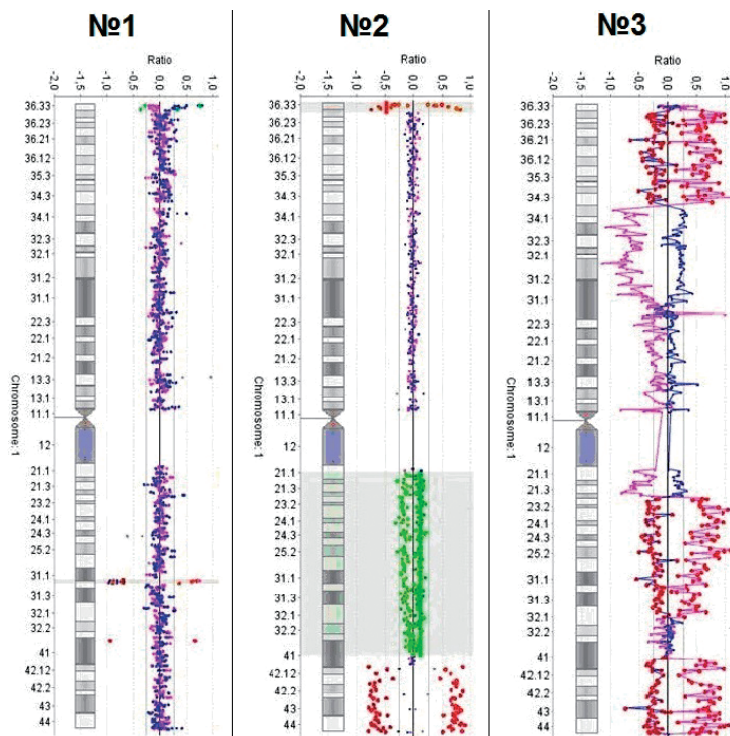


Рис. 1. Результаты aCGH хромосомы 1 в трех миоматозных узлах. Миоматозный узел № 1: интерстициальная делеция локуса 1q31.2 и субтеломерная делеция в сочетании с дупликацией локуса 1p36.33. Миоматозный узел № 2: терминальные делеции локусов 1p36.3 и 1q42 и дупликация локуса 1q21q41. Миоматозный узел № 3: множественные протяженные делеции и дупликации в коротком и длинном плечах.

Таблица

Содержание ядер, различающихся по числу локусов 1pTEL, 1p36, 1q25, выявленных методом FISH в четырех образцах миом. Содержание установлено при анализе 1000 ядер в каждом образце

Тип ядер	Число копий локусов 1pTEL, 1p36, 1q25	Содержание ядер в образцах миом № № 1—4, %			
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
1	1pTELx2, 1p36x2, 1q25x2	90,4	45,5	75	80,7
2	1pTELx1, 1p36x1, 1q25x2	2,6	42,7	4,9	13,2
3	1pTELx1, 1p36x1, 1q25x1	1,4	4,4	11	0,7
4	1pTELx2, 1p36x2, 1q25x1	4,8	2,1	8	4,9
5	1pTELx1, 1p36x2, 1q25x2	0,6	1	0,9	0,1
6	1pTELx3, 1p36x3, 1q25x3	0,2	0,2	0,2	0,4
7	1pTELx1, 1p36x1, 1q25x3	0	4,1	0	0

На втором этапе исследования в образцах миоматозных узлов методом FISH было установлено процентное содержание клеток с изменениями хромосомы 1. С учетом выявленных методом aCGH изменений в локусе 1p36-1pTEL, для проведения FISH был выбран набор ДНК-зондов, содержащий пробы специфичные к субтеломерному локусу короткого плеча (1pTEL), локусу короткого плеча (1p36) и локусу длинного плеча (1q25) хромосомы 1.

На фиксированных препаратах из некультивированных клеток миом анализировали число гибридационных сигналов в 1000 интерфазных ядер в каждом из четырех образцов. По характеру распределения гибридационных сигналов выделено 7 типов интерфазных ядер:

1. С двумя копиями каждого из локусов 1pTEL, 1p36, 1q25 хромосомы 1 (*1pTELx2, 1p36x2, 1q25x2*);
2. С одной копией каждого из локусов 1pTEL, 1p36, и двумя копиями локуса 1q25 (*1pTELx1, 1p36x1, 1q25x2*);
3. С одной копией каждого из локусов 1pTEL, 1p36 и 1q25 (*1pTELx1, 1p36x1, 1q25x1*);
4. С двумя копиями каждого из локусов 1pTEL, 1p36 и одной копией локуса 1q25 (*1pTELx2, 1p36x2, 1q25x1*);
5. С тремя копиями каждого из локусов 1pTEL, 1p36 и 1q25 (*1pTELx3, 1p36x3, 1q25x3*);
6. С одной копией локуса 1pTEL и двумя копиями каждого из локусов 1p36, 1q25 (*1pTELx1, 1p36x2, 1q25x2*);
7. С одной копией каждого из локусов 1pTEL, 1p36 и тремя копиями локуса 1q25 (*1pTELx1, 1p36x1, 1q25x3*).

Ядра типа 1—6 в разных процентных соотношениях обнаружены во всех четырех образцах, в то время как ядра типа 7 — только в образце № 2. Во всех исследованных образцах преобладали ядра типа 1 (45,5—90,4%), наиболее вероятно, содержащие 2 копии хромосомы 1. В образцах № 2 и № 4 выявлен высокий процент ядер типа 2, характеризующихся делецией локуса 1p36. Для всех образцов была характерна низкая частота ядер типа 5 с делецией субтеломерного района 1pTEL и ядер типа 6 с тремя копиями хромосомы 1 (таблица).

На третьем этапе исследования было определено наличие в миомах мутаций в экзоне 2 и прилегающих интронных последовательностях гена *MED12*. В образцах № 1,2,3 изменений не обнаружено. В образце № 4 в интроне 2 выявлена однонуклеотидная замена с.204+58G>C, не приводящая к нарушению процесса сплайсинга или изменению аминокислотной последовательности синтезируемого белка.

Обсуждение

В настоящем исследовании определен спектр изменений в структуре хромосомы 1 и установлена частота их встречаемости в клетках миом матки крупного размера. Известно, что в условиях культивирования соотношение клеток с различными аномалиями кариотипа может изменяться в связи с их разным потенциалом роста [8], поэтому настоящее исследование было проведено на некультивированных клетках.

Согласно полученным результатам, спектр изменений хромосомы 1 в миомах, определенный методом

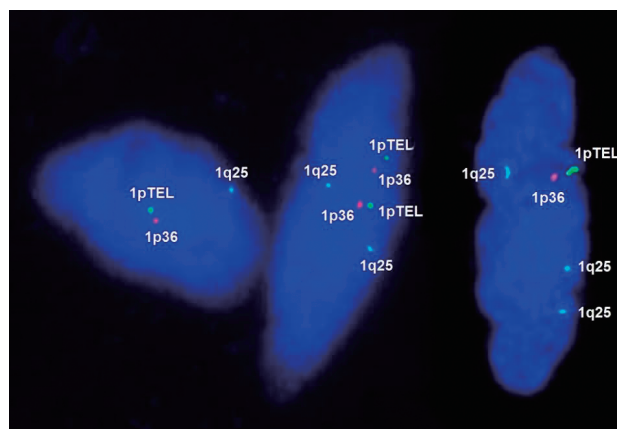


Рис. 2. Интерфазные ядра из некультивированных клеток миом после флуоресцентной гибридализации *in situ* с ДНК-зондами, специфичными к трем участкам хромосомы 1: 1pTEL (Vysis 1pTEL SpectrumGreen), 1p36 (Vysis LSI P58 SpectrumOrange), 1q25 (Vysis LSI 1q25 SpectrumAqua) (Abbott Molecular, США).

aCGH, включает как делеции, так и дупликации генетического материала. Учитывая, что aCGH не позволяет выявлять генетический дисбаланс в индивидуальных клетках миом, был проведен анализ числа копий локусов 1pTEL, 1p36 и 1q25 в индивидуальных клетках миом методом FISH. Клональное происхождение миом [9] дает основания ожидать отсутствие высокой межклеточной генетической вариабельности. Однако в настоящей работе все образцы миом состояли из нескольких субпопуляций клеток: мажорной с двумя копиями хромосомы 1 и минорных с генетическим дисбалансом по хромосоме 1. Представленность минорных субпопуляций клеток варьировала в разных узлах. Это позволяет предположить, что выявленные аберрации возникли в ходе роста миом. По всей видимости, они не являются триггерами начала опухолевого процесса, в отличие от первичных перестроек хромосом, таких, как делеция хромосомы 7 del(7)(q22q32) или мутации гена *MED12*, инициирующих трансформацию миоцита в опухолевую клетку [1].

Изученные нами миомы характеризовались крупным размером — 7—20 см в диаметре. С учетом того, что выявленные изменения хромосомы 1 были представлены минорными мозаичными формами, а мажорной субпопуляцией были клетки с двумя копиями хромосомы 1, можно предполагать, что частичное несоответствие данных aCGH и FISH связано с разным соотношением клеточных субпопуляций во фрагментах образцов, использованных для анализа.

Таким образом, установлена специфичность генетического дисбаланса хромосомы 1 для миом матки. Выявленные аномалии сочетались с отсутствием мутаций в гене *MED12* и были сходны между опухолями, однако представленность каждой аномальной субпопуляции клеток характеризуется вариабельностью. Во всех миомах клетки с аномалиями представлены минорными субпопуляциями, что свидетельствует о том, что выявленные аберрации хромосомы 1, скорее всего, не являются триггером возникновения, но могут быть значимыми для роста и развития опухоли.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование поддержано грантом РНФ № 14-15-00737. Ефимова О.А. и Тихонов А.В. являются получателями стипендии Президента РФ.

Список литературы

1. Commandeur AE, Styer AK, Teixeira JM. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth. *Hum Reprod Update*. 2015;21(5):593-615.
2. Sandberg AA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;158:1-26.
3. Makinen N, Mehine M, Tolvanen J et al. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science*. 2011;334(6053):252-5.
4. Hodge JC, Pearce KE, Clayton AC et al. Uterine cellular leiomyomata with chromosome 1p deletions represent a distinct entity. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(6):572.
5. Christacos NC, Quade BJ, Dal Cin P, Morton CC. Uterine leiomyomata with deletions of 1p represent a distinct cytogenetic subgroup associated with unusual histologic features. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(3):304-12.
6. Pendina AA, Efimova OA, Tikhonov AV et al. Immunofluorescent staining for cytosine modifications like 5-methylcytosine and its oxidative derivatives and FISH. In: Liehr T, editor. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*. 2nd ed. 2016. (In press).
7. Osinovskaya NS, Ivashchenko TE, Dolinskii AK et al. MED12 gene mutations in women with uterine myoma. *Russ J Genet*. 2013;49:1245-9.
8. Imreh MP, Gertow K, Cedervall J et al. In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J Cell Biochem*. 2006;99(2):508-16.
9. Mashal RD, Fejzo ML, Friedman AJ et al. Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origins of uterine leiomyomata and the secondary nature of cytogenetic aberrations in the development of leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;11(1):1-6.