

ДІАГНОСТИЧНЕ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГЕНА RASSF1 У ХВОРИХ НА НИРКОВО-КЛІТИННИЙ РАК

Г.В. Дубровська¹, К.В. Онищенко¹, Л.В. Перета², В.М. Григоренко², І.Я. Скрипкіна¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

² ДУ «Інститут урології НАМН України»

Вступ. Нирково-клітинний рак (НКР) – найбільш поширена злоякісна пухлина нирки, що включає в себе низку підтипів новоутворень нирки з різноманітними патогістологічними, генетичними та епігенетичними характеристиками. У 2016 р. в Україні було зареєстровано 4486 випадків захворювання на рак нирки, згідно з даними Національного Канцер Реєстру. За період 2016 року від цього типу раку померло 2030 осіб.

НКР є другою за поширеністю причиною смерті у всьому світі і становив 8,8 мільйона смертей у 2015 році. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я очікується, що протягом наступних двох десятиліть число нових випадків захворювання виросте приблизно на 70%.

Клінічні дослідження вказують, що НКР є майже нечутливим до променевої та хіміотерапії, тому основним методом лікування таких хворих є хірургічне видалення пухлини. Лише у 20% пацієнтів спостерігається слабка відповідь на хіміотерапію і лише 5% пацієнтів отримують повний ефект [1].

Також показано, що на момент виявлення захворювання у 25–30% пацієнтів діагностуються метастази і навіть після радикального оперативного лікування [2] 20–30% хворих не переживає 2-річного терміну. Однак, якщо захворювання виявлене на ранніх стадіях і не метастазує (поширюється на інші органи) або проникає глибше в тканини нирки, то 5-річна виживаність становить 65–90% [3]. Незважаючи на порівняно невелику частку в загальній структурі онкологічних захворювань, ці види раку є причиною смертності або інвалідності досить великої кількості пацієнтів через пізню діагностику, а також високу частоту виникнення рецидивів і прогресії.

Виявлення хворих на НКР є малоефективними у зв'язку з переважно безсимптомним перебігом ранніх стадій цього захворювання. На жаль, в Україні нині рання діагностика цього типу раку у пацієнтів без симптомів патології

складає лише 16%. У той же час, цей тип раку виліковний в більш ніж 90% випадків, якщо діагноз поставлений на ранній стадії. Тому вкрай важливо розробити методи ранньої діагностики НКР, а також, як ніколи гостро, постає питання точного визначення типу пухлини і її молекулярно-генетичних особливостей, через те, що таргетна терапія в більшості випадків є високо специфічною та більш ефективною.

Рак завжди пов'язаний з різноманітними молекулярно-генетичними змінами і порушеннями, що стають причиною утворення та подальшого розвитку пухлин. Завдяки детекції цих змін стає можливим прогнозувати перебіг захворювання [4].

Розвиток НКР пов'язаний з низкою змін у багатьох генах-супресорах, які можуть інактивуватися в результаті мутацій, протяжних алейних делецій [5], метилування CpG-острівців у промоторних ділянках [6]. У нормальних соматичних клітинах більшість CpG-острівців не метильовані. Аберрантне метилування CpG-острівця будь-якого гена-супресору пухлинного росту може призвести до припинення його експресії, сприяючи ініціації та прогресії пухлини.

Відомо, що мікросателітні перебудови можуть виступати як потенційні мішені діагностики раку [7]. Для розвитку РН найбільш типовими генетичними аномаліями є делеції, які відбуваються на короткому плечі хромосоми 3 (LOH 3p) [8]. Вона складає близько 75,8% всіх випадків. Ця аномалія збігається з проявом хвороби фон Хиппеля-Ліндау з частотою 34–56% випадків при розвитку одиначної карциноми [9].

Суперсімейство RAS-малигх ГТФ-зв'язуючих білків відіграє вирішальну роль у внутрішньоклітинних шляхах сигналізації, а головним чином, в активації MAPK каскаду [10].

Ген RASSF1 (Ras association domain family1) розташований на довгому плечі хромосоми 3 (локус 3p21.3) та має вісім екзонів (1 α , 1 β , 2 $\alpha\beta$, 2 γ , 3, 4, 5, та 6). RASSF1 – досить добре вивчений онко-супресор, який може впливати на клітинний цикл,

динаміку тубуліну, апоптоз та стабілізацію мікротрубочок [11]. Існують сім різних ізоформ RASSF1, які утворюються внаслідок диференціального використання двох промоторів та альтернативного сплайсингу. На сьогодні встановлена біологічна роль лише двох білкових ізоформ – RASSF1A та RASSF1C, що є основними ізоформами RASSF1. Ізоформа А транскрибується від верхнього промотору, а ізоформа С – від нижнього. Обидві промоторні ділянки містять незалежні CpG-острівці. Метилування кожного з них вимикає транскрипцію RASSF1. Також було виявлено, що гіперметилування першого промотора асоційовано із виникненням різних типів пухлин [12].

У цьому дослідженні було проаналізовано ступінь метилування CpG-острівця А-ізоформи гена, а також мікросателітні перебудови гена RASSF1 з використанням високополіморфних маркерів D3S966 та D3S1568.

Дана робота присвячена оптимізації наявних та створенню нових методичних підходів з аналізу статусу метилування вибраних генів-маркерів та визначенню мікросателітних перебудов для впровадження в діагностичну практику з метою раннього виявлення порушень в організмі людини, пов'язаних з розвитком онкологічних хвороб, зокрема, РН.

Матеріали та методи дослідження. Групу обстеження склали 50 хворих із верифікованим

діагнозом рак нирки, у яких зі зразків пухлин та умовно здорових тканин була виділена генерна ДНК (табл. 1). Розчин та реактиви для виділення генерної ДНК: «Gene Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit» («Sigma», США).

Визначення алельного дисбалансу в локусі гена RASSF1 виконували з використанням високополіморфних маркерів D3S966 та D3S1568 для РН в парних зразках пухлинної і умовно нормальної тканини методом ПЛР. Реакційна суміш для проведення ПЛР загальним об'ємом 20 мкл складалась з 300 нг генерної ДНК, 1X DreamTaq Green Buffer («Thermo Scientific», США), 200 мкМ dNTP, 1,5 од. DreamTaq DNA polymerase («Thermo Scientific», США) і 200 мкМ кожного з праймерів. Ампліфікацію здійснювали з наступних умов: денатурація – +96 °С, 1 хв. (в першому циклі – 4 хв.); реасоціація праймерів протягом 1 хв. за відповідних температур (табл. 2), синтез – +72 °С; 40 циклів. Прилад для проведення ампліфікації «Applied Biosystems 2720® thermal cycler» («Applied Biosystems», США). Детекцію продуктів ПЛР проводили за допомогою методу вертикального гель-електрофорезу в 8% ПААГ у 1xTBE буфері (0,02 М ЕДТА, 1 М тріс, 1 М борна кислота, рН 8,3). Для приготування ПААГ брали 6,665 мл 30% акриаміду, 2,5 мл 10xTBE, 200 мкл 10xПСА (персуль-

Таблиця 1
Медичні дані пацієнтів з раком нирки,
зразки яких використовували у роботі

Параметри	Кількість пацієнтів
Вік >55	33 (66%)
Вік <55	17 (33%)
Ч/Ж	32/18 (64% / 36%)
Стадії 1–2	44 (88%)
Стадії 3–4	6 (12%)
T _{1a+b} N ₀ M ₀₋₁	28 (56%)
T _{2 a+b} N ₀ M ₀	13 (26%)
T _{3 a+b} N ₀₋₁ M ₀₋₁	9 (18%)

Таблиця 2
Умови проведення ПЛР для мікросателітного аналізу

Маркер	T °C	Послідовність праймерів	Розмір (п.н.)
D3S966 [13]	58 °C	F 5' – TACCTCCTCACRGTTCATATTAG – 3'	120
		R 5' – CACATAGTATGTTCTCGGCTAAGAG – 3'	
D3S1568 [14]	60 °C	F 5' – CCATGAACAGAACCTCCCTA – 3'	284
		R 5' – CCGCTGTCCTGCTGTAAG – 3'	

фат амонію) та 15,650 мл деіонізованої води. Візуалізацію розділених продуктів ПЛР після фарбування бромистим етидієм проводили за допомогою ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, США).

Епігенетичну мінливість транскрипту RASSF1A визначали за допомогою метил-специфічної ПЛР, для чого попередньо проводили бісульфітну обробку ДНК з використанням набору EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США).

Реакцію проводили використовуючи наступні послідовності праймерів: F 5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3' та R 5'-AACCCCGCGAАСТАААААСGA -3' (169 п.н.) у приладі для проведення ампліфікації «Applied Biosystems 2720® thermal cycler» («Applied Biosystems», США) з використанням набору реагентів «DreamTaq Green Polymerase» («Thermo Scientific», США). Реакцію проводили в 20 мкл суміші згідно з протоколом до використаного реагенту.

Ампліфікацію здійснювали за наступними умовами: перший цикл денатурації за температури 95 °C протягом 5 хв., денатурація за температури 95 °C протягом 30 с, температура реасоціації праймерів – 58 °C 20 с, синтез – 72 °C 20 с. Всього 40 циклів. У якості позитивного контролю використовували штучно метильовану ДНК, отриману за допомогою набору реактивів «CpG Methyltransferase (M. SssI)» («Thermo Scientific», США). Для ідентифікації очікуваних фрагментів проводили ПЛР-продуктів у 1,5%-вому агарозному гелі та візуалізували шляхом фарбування бромистим етидієм з подальшою документацією результатів за допомогою ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, США).

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета прикладних програм STATISTICA 7.0 (StatSoft. Inc., США). Статистичну значимість відмінностей між досліджуваними групами аналізували за допомогою точного критерію Фішера та U-критерію. Відмінності вважалися статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Детекцію мікросателітних змін проводили за шляхом визначення змін двох високополіморфних маркерів,

що локалізовані на хромосомі 3 людини (локуси 3p21.3 та 3p25.3) за допомогою ПЛР-аналізу на гДНК з біопсій пухлин пацієнтів з РН та навколишньої умовно здорової тканини, взятої не менше 1,5 см від місця ураження. Мікросателітний аналіз був проведений для 50 пацієнтів і включав два мікросателітні маркери гена RASSF1 (D39S966 та D3S1568). Інформативність маркера D39S966 склала 94% (47 з 50), а маркера D3S1568 – 80% (44 з 50).

У пухлинах РН сумарна втрата гетерозиготності (LOH) за двома маркерами локуса гена RASSF1 склала 35,4%: за маркером D39S96 – 14,9% пацієнтів (7 з 47), за маркером D3S1568 – 20,5% (9 з 44) пацієнтів, відповідно.

Отримані нами дані щодо епігенетичних порушень транскрипту А гена RASSF1 склали 72% (36 з 50) метилування гДНК з пухлин та 42% (21 з 50) метилування гДНК з прилеглих (умовноздорових тканин) у пацієнтів з РН. Для цього гена було обраховано чутливість та специфічність і вони склали 68% та 30%, відповідно. Висунуто припущення, що одночасне виявлення на ДНК здорової паренхіми нирки метилування RASSF1A та алельного дисбалансу за маркерами D39S966 та D3S1568 може бути ознакою несприятливого прогнозу для даного пацієнта з раком нирки, що потребуватиме додаткового післяопераційного лікування.

Висновки

Отже, в результаті проведених досліджень з виявлення структурних та епігенетичних змін гена RASSF1 (втрата гетерозиготності та метилування промотора) у пухлинах РН отримані дані, які свідчать про те, що висока частота інактивації RASSF1 як за допомогою LOH (35,4%), так і за допомогою метилування (72%), що спостерігається при даному типі онкологічного захворювання може бути використана у подальшому для створення тест-системи ранньої неінвазивної діагностики карциноми нирки на позаклітинних ДНК плазми крові.

Робота виконана при грантовій підтримці Національної академії наук України за конкурсним проектом Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (проект 0115U002951).

Список літератури

1. Cohen H. T. Renal-cell carcinoma / H. T. Cohen, F. J. McGovern // *N Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353, N 23. – P. 2477–2490.
2. Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma / J. S. Lam [et al.]. // *World J. Urol.* – 2005. – Vol. 23, N 3. – P. 202–212.

3. NHS [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <http://www.nhs.uk/conditions/Cancer-of-the-kidney/Pages/Introduction.aspx> (дата звернення 22.04.2017).
4. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis / A. Lujambio [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 105, N 36. – P. 13556–13561.
5. Shah S.N. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes / S.N. Shah, S.E. Hile, K.A. Eckert // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, № 2. – P. 431–435.
6. Kawakami K. DNA methylation and cancer metastasis / K. Kawakami, T. Minamoto // *Gan. to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy.* – 2010. – Vol. 37(11). – P. 2042–2046.
7. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment/ Kristensen L.S., Hansen L.L. // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55. – P. 1471–1483.
8. Histopathology and molecular genetics of renal tumors: toward unification of a classification system / Zambrano N.R., Lubensky I.A., Merino M.J. et al. // *J. Urol.*, – 1999. – N 163. – P. 1246–1258.
9. Rini B.I. Renal cell carcinoma / B.I. Rini, S.C. Campbell, B. Escudier // *Lancet. Elsevier Ltd.* – 2009. – Vol. 373, N 9669. – P. 1119–1132.
10. Katza M.E. Signal transduction from multiple Ras effects // M.E. Katza, F. McCormick // *Current Opinion in Genetics & Development.* – 1997. – Vol. 7, N 1. – P. 75–79.
11. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor / L. Liu [et al.] // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, N 50, – P. 8125–8136.
12. Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21.3 / R. Damman [et al.] // *Nat Genet.* – 2000. – Vol. 25, N 3, – P. 315–319.
13. Loss of Heterozygosity (LOH) on Chromosome 2q, 3p and 21q in Indian Oral Squamous Cell Carcinoma / N. Yamamoto [et al.] // *Bull Tokyo Dent Coll.* – 2007. – Vol. 48, N 3. – P. 109–117.
14. Investigation of allelic imbalances on chromosome 3p in nasopharyngeal carcinoma in Tunisia: High frequency of microsatellite instability in patients with early – onset of the disease / M. Trimeche [et al.] // *Oral Oncology.* – 2008. – Vol. 44. – P. 755–783.

Реферат

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНА RASSF1 У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

Г.В. Дубровская, К.В. Онищенко,
Л.В. Перета, В.Н. Григоренко,
И.Я. Скрипкина

Цель. Все большую актуальность приобретает изучение молекулярно-генетических изменений, обуславливающих злокачественную трансформацию клеток и определяющих биологическое поведение опухоли, как перспективных диагностических и прогностических маркеров. Целью исследования было определение статуса метилирования и потери гетерозиготности гена RASSF1A в злокачественных опухолях почки и оценка возможности его применения в качестве клинического маркера.

Методы. Определение аллельного дисбаланса в локусе гена RASSF1 выполняли с использованием высокополиморфных маркеров D3S966, D3S1568 для рака почки (РП) в парных образцах опухолевой и условно нормальной ткани методом ПЦР с последующей детекцией про-

Summary

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF RASSF1 GENE IN KIDNEY CARCINOMA

H.V. Dubrovska, K.V. Onyshchenko,
L.V. Pereta, V.M. Grygorenko,
I.Ya. Skrypkina

It becomes more and more relevant to study as the promising diagnostic and prognostic markers the epigenetic and genetic changes that determine the malignant transformation of cells and biological behavior of tumors. The purpose of our research was to study the loss of heterozygosity of the RASSF1 gene and the status of methylation of the locus of the RASSF1A gene in malignant tumors of the kidneys and to assess the potential for its use as a marker in clinical practice.

The determination of the allele imbalance in the RASSF1 gene locus was performed by PCR using highly polymorphic markers D3S966, D3S1568 for renal cancer (RC) in paired samples of tumor and conditionally normal tissue and the PCR products detection in polyacrylamide gels. The epigenetic variability analysis of the RASSF1A gene was performed by using methyl-specific PCR, which

дуктов ПЦР в полиакриламидном геле. Эпигенетические изменчивость промотора гена RASSF1A определяли с помощью метил-специфической ПЦР, для чего предварительно проводили бисульфитное обработку ДНК. Статистическую значимость различий между исследуемыми группами анализировали с помощью точного критерия Фишера и U-критерия.

Результаты. Проведенные исследования показали прогностическую значимость инактивации RASSF1A при РН. Степень метилирования геномной ДНК гена RASSF1A составила 72%, а потеря гетерозиготности – около 35,4%.

Выводы. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что ген RASSF1 может стать кандидатом для включения в прогностическую систему клинического течения данного типа рака.

Ключевые слова: рак почки, эпигенетические изменения, метилирование, потеря гетерозиготности, rassf1.

Адреса для листування

Г.В. Дубровська

E-mail: dubrovskaya@univ.net.ua

was preceded by bisulfite DNA treatment. The statistical significance of the differences between the study groups was analyzed by using F-test and the U-test.

Our studies showed the predictive value of inactivation of RASSF1A in RC. The methylation level of the genomic DNA of the RASSF1A loci of the RASSF gene was 72%. The loss of the heterozygosity of the RASSF1 gene in this type of oncological disease was about 35.4%.

The results may indicate that the gene RASSF1 can become a candidate for inclusion in the prognostic system of clinical course of the disease.

Keywords: kidney cancer, epigenetic changes, methylation, loss of heterozygosity, rassf1.