

ОНИЩЕНКО К. В.<sup>1</sup>, ГРИГОРЕНКО В. М.<sup>2</sup>, ПЕРЕТА Л. В.<sup>2</sup>, СЕРБАЙ Ю. Р.<sup>1</sup>,  
ВОЙЦЬКИЙ Т. В.<sup>1</sup>, СКРИПКІНА І. Я.<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

<sup>2</sup> ДУ «Інститут урології НАМН України»,  
Україна, 04053, м. Київ, вул. Ю. Коцюбинського, 9-А

✉ [i.skrypkina@imbg.org.ua](mailto:i.skrypkina@imbg.org.ua), (044) 526-34-98

## ГЕНЕТИЧНІ ТА ЕПІГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ ГЕНА *VHL* У ПУХЛИНАХ СВІТЛОКЛІТИННОГО РАКУ НИРКИ

**Мета.** Нирково-клітинні карциноми (НКК) – злоякісні новоутворення сечостатевої системи, на які припадає близько 3 % злоякісних пухлин людини. Для індексації ступеня злоякісності та типу пухлин здебільшого використовують таку характеристику, як форма ядра, але показниками особливості перебігу НКК можуть бути генетичні зміни, зокрема інактивация гена фон Гіппеля-Ліндау, *VHL*. Метою дослідження було визначення статусу метилування та втрати гетерозиготності гена *VHL* в пухлинах нирки та оцінка можливості його застосування як клінічного маркера. **Методи.** Визначення алельного дисбалансу в локусі гена *VHL* виконували за допомогою ПЛР STR-маркерів із подальшим розділенням фрагментів у 8 % ПААГ та методом детекції флуоресцентно мічених фрагментів капілярним гель-електрофорезом. Епігенетичну мінливість промотору гена *VHL* визначали шляхом метил-специфічної ПЛР. Статистичну значущість відмінностей між зразками пухлин та прилеглих тканин нирки аналізували за допомогою точного критерію Фішера та U-критерію. **Результати.** Втрата гетерозиготності гена *VHL* була виявлена у 57 % зразків пухлин за маркером D3S1038 та 48 % – за маркером D3S1317. Інформативність для цих локусів становила 84 % для D3S1038 та 90 % – для D3S1317. Метилування промотора гена *VHL* склало – 77 %. **Висновки.** Отримані результати свідчать про те, що ген *VHL* – один із кандидатів для включення не тільки в діагностичну, але й у прогностичну систему клінічного перебігу окресленого типу раку.

**Ключові слова:** світлоклітинний рак нирки, епігенетичні зміни, метилування, втрата гетерозиготності, *VHL*.

Нирково-клітинний рак (ПКР) є найбільш поширеною злоякісною пухлиною дорослої нирки, на яку припадає близько 3 % злоякісних пухлин людини [1]. Повна хірургічна резекція вважається єдиним ефективним методом лікування пацієнтів із клінічно локалізованим ПКР, проте захворювання рецидивує в післяопераційному періоді у 20–40 % пацієнтів, які піддаються потенційно лікувальній нефректомії [1]. Наразі основним методом діагностики та класифікації раку нирок є гістологічний аналіз біопсії пухлин. Отож, дуже важливим є пошук молекулярно-генетичних маркерів для характеристики підтипів раку, адже гістологічний аналіз дуже часто може бути неточним, а хибне визначення підтипу раку призводить до проведення неправильного курсу лікування та підвищення рівня смертності.

Розвиток світлоклітинного раку нирки (скРН) пов'язаний із низкою змін у багатьох генах-супресорах. Вони можуть інактивуватися в результаті мутацій, протяжних алельних делецій або метилування CpG-острівців у промоторних частинах і можуть використовуватися як специфічні онкомаркери для класифікації та визначення стратегії лікування [2–4]. Внутрішньогенні мутації та аберрантне гіперметилування гена-супресора пухлини фон Гіппеля-Ліндау (*VHL*, локус 3p25.3) були раніше виявлені як у спорадичних НКК [5–7], так і у світлоклітинному підтипі раку [5, 8]. Ці зміни гена не варіювалися залежно від прогресії пухлини, включаючи її розмір, стадію, класифікацію, віддалені метастази і метастази в лімфатичні вузли. Таким чином, вважається, що інактивация гена *VHL* є ранньою або першою причиною на шляху утворення пухлин світлоклітинного раку [9]. Реінтродукція продукта гена *VHL* дикого типу (pVHL) в клітини скРН з дефіцитом *VHL* може

© ОНИЩЕНКО К. В., ГРИГОРЕНКО В. М., ПЕРЕТА Л. В., СЕРБАЙ Ю. Р.,  
ВОЙЦЬКИЙ Т. В., СКРИПКІНА І. Я.

пригнічувати ріст пухлини *in vivo* і *in vitro* [10, 11]. Отже, ген *VHL*, швидше за все, відіграє критичну роль в онкогенезі скРН. Показано, що pVHL контролює індуковані гіпоксією гени, включаючи гени фактора росту ендотелію судин, переносника глюкози GLUT-1 і карбоангідрази [12, 13]. Крім того, VBP1, протеїнкіназа C, Sp1 і фибронектин взаємодіють із pVHL, що дозволяє припустити, що ген *VHL* може мати множинні функції пригнічення пухлин [14–17]. Соматична мутація гена *VHL* є однією з найбільш частих генетичних змін, які спостерігаються у пухлинах скРН. Masahiro Yao [18] показали прогностичну значущість взаємозв'язку між мутаціями *VHL* і виживанням пацієнтів за спорадичного скРН. Вони визначили, що, незалежно від віку, статі та інших показників, хворі з ранньою прогресією раку (I–III стадії) мають кращі показники виживання за гіперметилування та мутацій гена *VHL*. Отже, метою цього дослідження було визначення можливих генетичних та епігенетичних змін гена *VHL* для визначення в подальшому їх вагомості як клінічних показників виживання досліджуваних пацієнтів української популяції хворих на світлоклітинний рак нирки.

### Матеріали і методи

Для дослідження метилування генів-супресорів пухлини нирки було використано по 50 зразків ДНК, виділених на першому етапі виконання проекту з пухлин та прилеглих до пухлини тканин пацієнтів ( $\geq 1$  см), взятих під час хірургічного втручання у пацієнтів зі світлоклітинною карциномою нирок (ДУ «Інститут урології» АМН України, м. Київ) за їх згоди протягом 2017–2018 рр. (табл. 1). Хворі до оперативного втручання були дообстежені в повному обсязі, відповідно до протоколів Міністерства охорони здоров'я: лабораторно-клінічні аналізи, променеві методи дослідження (ультразвукова діагностика з доплерографією, реносцинтиграфія, спіральна комп'ютерна/магніто-резонансна томографія органів заочеревинного простору). Розподіл пацієнтів із раком нирки за віком та стадією розвитку хвороби представлено в таблиці 1. Зразки біопсій тканин та пухлини нирки транспортували у рідкому азоті і до використання зберігали за  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Виділення геномної ДНК зі зразків пухлин та прилеглих тканин нирки хворих з раком проводили за допомогою набору «Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit» (Sigma, Німеччина) згідно з протоколом, розробленим виробником. Отримані зразки ДНК зберігали до використання за  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для перевірки метилування ДНК спочатку піддавали бісульфитній конверсії, а потім проводили метил-специфічну полімеразно-ланцюгову реакцію (МС-ПЛР). Бісульфитну конверсію ставили за допомогою спеціалізованого набору «E.Z. DNA Methylation Kit50» («Zymo Research Corporation», США) за протоколом виробника. МС-ПЛР здійснювали, використовуючи праймери до метильованої форми CpG-острівця промотору гена *VHL* (5'-TGGAGGATTTTTTTGCGTACGC-3' та 5'-AACCGAACGCCGCGAA-3') за таких умов: перший цикл денатурації за температури  $95^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв, 40 циклів: денатурація –  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 с, температура реасоціації праймерів –  $60^{\circ}\text{C}$ , 15 с, елонгація –  $72^{\circ}\text{C}$ , 20 с. Електрофоретичне розділення утворених фрагментів проводили у 1,5 % ТАЕ-агарозному гелі.

Визначення алейного дисбалансу в локусі гена *VHL* виконували з використанням високополіморфних маркерів D3S1038 та D3S1317 в парних зразках пухлинної і умовно нормальної тканини методом ПЛР у приладі для проведення ампліфікації «Thermal Cycler 2720» («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш для проведення ПЛР, загальним об'ємом 20 мкл, складалася з 30 нг геномної ДНК, 1X HotStarTaq Buffer («Thermo Scientific», США), 200 мкМ dNTP, 1,5 од HotStarTaq DNA polymerase («Thermo Scientific», США) і 200 мкМ кожного з праймерів. Для D3S1038 локусу використовували праймери 5'-TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG-3' та 5'-AAAGGGGTTTCAGGAAACCTG-3' (115 п. н.), для D3S1317 – 5'-TACAAGTTCAGTG-GAGAACC-3' та 5'-CCTCCAGGCCATACACAGTCA-3' (184 п. н.). У випадку детекції фрагментів шляхом капілярного електрофорезу прямий праймер мітили з 5'-кінця флуоресцентною міткою FAM. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація –  $96^{\circ}\text{C}$ , 1 хв (в першому циклі – 4 хв); реасоціація праймерів упродовж 1 хв за  $55^{\circ}\text{C}$ ; синтез –  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 хв; 40 циклів.

Таблиця 1. Медичні дані пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки, зразки яких застосовані у дослідженні

Пацієнти з раком нирки	Кількість пацієнтів
Вік >55; Ч/Ж	33 (%); 21/12 (42 %/24 %)
Вік <55; Ч/Ж	17 (%); 11/6 (22 %/12 %)
стадія 1-2	44 (88 %)
стадія 3-4	6 (12 %)
T <sub>1a+b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	28 (56 %)
T <sub>2 a+b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	13 (26 %)
T <sub>3</sub> N <sub>0-1</sub> M <sub>0</sub>	9 (18 %)

Розділення продуктів ПЛР за молекулярними масами проводили за допомогою методу вертикального гель-електрофорезу у 8 % поліакриламідному гелі (8 % ПААГ) у 1xTBE буфері з подальшою візуалізацією результатів (після фарбування бромистим етидієм) за допомогою приладу «ChemiDoc™ XRS+ System» («Bio-Rad», США) та програмного забезпечення до нього («ImageLab2.0»). Серед інформативних випадків втрати алелі рахувалися, якщо інтенсивність сигналу одного алеля пухлинної ДНК була менша, більше ніж на 40 % (у порівнянні з відповідним алелем в ДНК нормальній тканини).

Для детекції алельного дисбалансу шляхом розділення продуктів ПЛР капілярним гель-електрофорезом 0,5 мкл ПЛР-продукту змішували з 0,5 мкл маркера фрагментів GeneScan 500 LIZ dye Size Standard («Applied Biosystems», США) та 9 мкл формаміду Hi-Di™ Formamide («Applied Biosystems», США). Суміш денатурували 2 хв за 95°C, швидко охолоджували на льоду і розділяли за допомогою автоматичного ДНК-аналізатора «Genetic Analyser 3130» («Applied Biosystems», США). Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення GeneMapper Software V3.0 («Applied Biosystems», США).

Втрата гетерозиготності (ЛОН) визначалася обчисленням відношення інтенсивностей двох алелів зі зразка пухлини до зразка прилеглої тканини, який служив у якості еталонної ДНК. ЛОН інтерпретувалася, якщо кінцевий коефіцієнт був меншим, ніж 0,6, або більшим, ніж 1,67. Гомозиготи і відсутність піків, які можна визначити, позначали як неінформативні випадки.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета прикладних програм STATISTICA 7.0 (StatSoft. Inc., США). Статистичну значущість відмінностей між досліджуваними групами аналізували за допомогою точно-

го критерію Фішера та U-критерію. Відмінності вважалися статистично значущими за  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Аналіз отриманих результатів показав метилування гена *VHL* на ДНК пухлини у 77 % визначених зразків (17 з 43) (рис. 1). Результати за зразками 7 пацієнтів (14 %) були неінформативні. Це збігається з раніше виявленою неінформативністю визначення втрати алельного дисбалансу за мікросателітними маркерами гена *VHL* і може бути зумовлене наявністю делецій на ділянці цього гена, що притаманна для хромосоми 3 людини у клітинах такого виду пухлин [19, 20]. У прилеглих до пухлин тканинах нирки було виявлено 2 зразки, метилування яких неможливо було визначити, що також може бути пов'язане з делеціями 3-ї хромосоми, адже неможливо виявити 100 % здорову тканину у прилеглий паренхімі. Метилування CpG-острівця гена *VHL* умовно здорової тканини нирки в інформативних зразках (48) визначили у 2-х зразках, що становить 4 %. Таким чином, чутливість за використання цього маркера, складала 77 %, специфічність – 92 %.

Результати ПЛР до ділянок геномної ДНК, що зазнає втрати гетерозиготності за STR-маркерами внаслідок мікроделецій, були проаналізовані у 8 % ПААГ, інформативність якого варіювала для різних маркерів (рис. 2).

Інформативність детекції мікросателітних змін у ПААГ для маркера D3S1038 складала 74 % (37 з 50), для маркера D3S1317 – 70 % (35 з 50) (табл. 2). Втрату гетерозиготності за маркером D3S1038 визначили у 42,24 % (16 з 37) та за маркером D3S1317 – у 31,42 % (11 з 35) пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки. Одночасні делеції були детектовані тільки для двох маркерів у 27 % зразків (10 з 37 інформативних).

Одержані дані не відповідають даним, отриманим іншими дослідниками [16–18], що може бути пов'язане з особливістю української

популяції хворих. Також низька інформативність використання таких маркерів та невисокий результат із детекції мікросателітних змін може пояснюватися низькою роздільною здатністю електрофорезу в поліакіламідному гелі, де можна виявити втрату тільки не менш ніж 4-6 п. н., у той час, як різниця може бути у втраті 2 п. н. в обраних маркерах.

Тому для розділення і детекції фрагментів ПЛР STR-маркерів додатково використовували більш точний метод фрагментного аналізу у автоматичному ДНК-аналізаторі, за допомогою якого можна виявити навіть однонуклеотидний поліморфізм. Це підвищило інформативність використання досліджуваних маркерів гена *VHL* (рис. 3) і дозволило виявити алельний дисбаланс у більшій кількості зразків та підвищити достовірність використання названих маркерів для характеристики пухлин світлоклітинного раку нирки (табл. 2).

Інформативність використання маркерів гена *VHL* склала 90 % (45 з 50) для маркера

D3S1038 та 84 % для маркера D3S1317 (42 з 50) (табл. 2).

Аналіз результатів розділення флуоресцентномічених фрагментів ПЛР виявив втрату гетерозиготності за маркером D3S1038 гена *VHL* у 57,8 % (26 з 45) та за маркером D3S1317 у 47,6 % (20 з 42) пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки. Одночасні делеції були детектовані у 59,5 % зразків (25 з 42 інформативних).

Сумарна втрата гетерозиготності за обома досліджуваними маркерами за використання флуоресцентномічених фрагментів склала 76 % (32 з 42 інформативних зразків), інформативність – 92 % (46 з 50). Ці результати можна пояснити тим, що на короткому плечі хромосоми 3 людини спостерігаються не тільки мікросателітні зміни, але й втрати більш довгих ділянок ДНК за деяких типів раку. За світлоклітинної карциноми нирки ці делеції частіше пов'язані саме з ділянкою гена Фон Хіппеля-Ліндау. Тому саме з порушеннями у цьому гені раніше пов'язували виникнення раку нирки [21, 22].

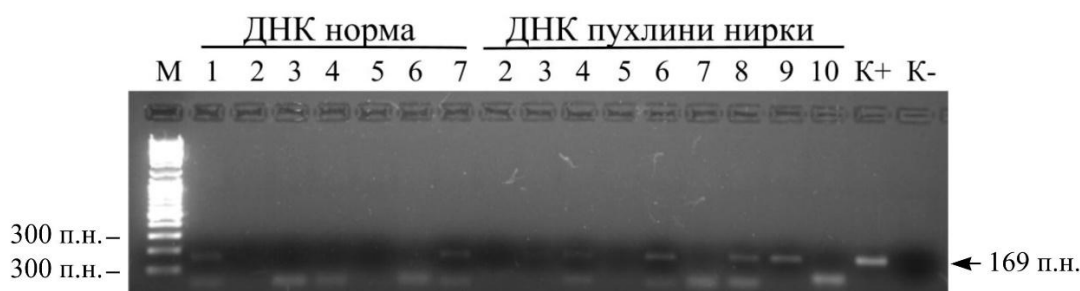


Рис. 1. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК, виділених із пухлин та умовно здорових тканин онкохворих на рак нирки з праймерами до гена *VHL* (158 п. н.). К+ – позитивний контроль ПЛР на штучно метильованій ДНК людини. К– – негативний контроль ПЛР без додавання матриці. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific», США).

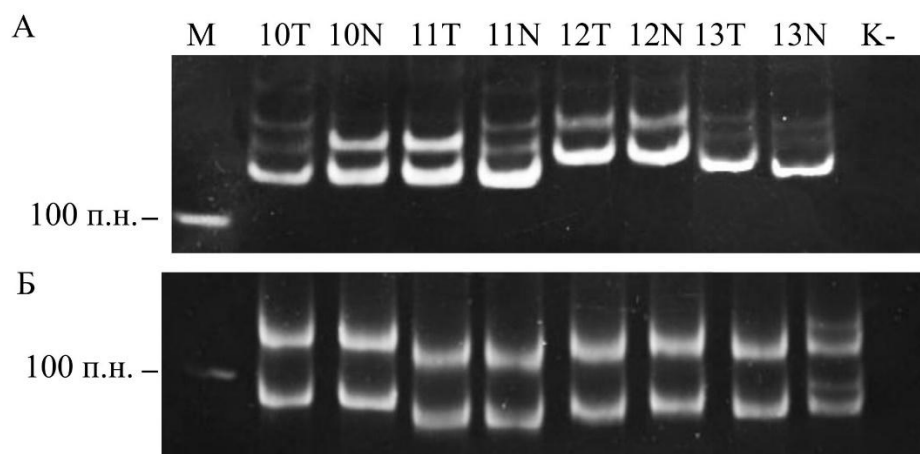


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР зразків геномної ДНК, виділених із біопсій пухлини (Т) та прилеглих тканин паренхіми нирки (N) пацієнтів із раком нирки з використанням праймерів до STR-маркера D3S1038 (А) та D3S1317 (Б) гена *VHL*. К– – негативний контроль ПЛР без додавання матриці; М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific», США).

Таблиця 2. Результати визначення мікросателітних змін зразків ДНК, отриманих від хворих із раком нирки

Ген	Маркер	Інформативність маркера		Частота алейного дисбалансу*	
		ПААГ	Капілярний електрофорез	ПААГ	Капілярний електрофорез
<i>VHL</i>	D3S1038	74%	90%	42%	58%
	D3S1317	70%	84%	31%	48%
Разом	<i>VHL</i>	86%	92%	48%	76%

Примітка. \* – Стосовно інформативних зразків.

Існують припущення, що втрата гетерозиготності і мутації в гені *VHL* у пацієнтів із НКК корелюють із більш сприятливим прогнозом захворювання в порівнянні з тими пацієнтами, у яких ген *VHL* не інактивований [18, 23]. На сьогодні ми провели кореляційний аналіз клініко-патологічних параметрів пухлин, віку, статі пацієнтів залежно від наявності або відсутності втрати гетерозиготності та метилування гена *VHL*, але будь-яких статистично значущих асоціацій виявлено не було ( $p > 0.05$ ). В подальшому на основі отриманих даних буде проводитися аналіз виживання пацієнтів.

## Висновки

Наші результати підтверджують вагому роль гена *VHL* у канцерогенезі нирки, зокрема світлоклітинної карциноми. Висока частота інактивації гена як за допомогою мікросателітних делецій (76 %), так і за допомогою метилування промотору (77 %), що спостерігається за такого типу онкологічного захворювання, може бути використана у подальшому для створення тест-системи ранньої неінвазивної діагностики на позаклітинних ДНК плазми крові та визначення прогнозу виживання пацієнтів із цією онкопатологією.

*Публікація містить результати досліджень, проведених за грантової підтримки за конкурсними проектами Національної академії наук України 115U002951 та ДФФД України (договори 0116U007719 та 0117U002802).*

## References

1. Beldegrum A., deKernion J.B. Renal tumors / In: Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D.Jr, Wein A.J., editors. Campbell's urology. 7<sup>th</sup>ed. Philadelphia (PA): W.B. Saunders Company. 1998. P. 2283–22326.
2. Gupta K., Miller J.D., Li J.Z., Russell M.W., Charbonneau C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treatment Reviews*. 2008. Vol. 34. P. 193–205. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.12.001.
3. Virtanen I., Lehto V.P. Progression of malignancy in clear cell renal cell carcinomas. *Scand J Surg*. 2004. Vol. 93. P. 112–117. doi: 10.1177/145749690409300205.
4. Linehan W.M., Vasselli J., Srinivasan R., Walther M.M., Merino M., Choyke P., Vocke C., Schmidt L., Isaacs J.S., Glenn G., Toro J., Zbar B., Bottaro D., Neckers L. Genetic Basis of Cancer of the Kidney: Disease-Specific Approaches to Therapy. *Clin. Canc. Res*. 2004. Vol. 10. P. 6282–6289. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-050013.
5. Gnarr J.R., Tory K., Weng Y., Schmidt L., Wei M.H., Li H. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*. 1994. Vol. 7. P. 85–90. doi: 10.1038/ng0594-85.
6. Shuin T., Kondo K., Torigoe S., Kishida T., Kubota Y., Hosaka M., Nagashima Y., Kitamura H., Latif F., Zbar B. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 1994. Vol. 54. P. 2852–2855.
7. Herman J.G., Latif F., Weng Y., Lerman M.I., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D.S., Gnarr J.R., Linehan W.M. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. Vol. 91. P. 9700–9704.
8. Brauch H., Weirich G., Brieger J., Glavac D., Rodl H., Eichinger M., Feurer M., Weidt E., Puranakanittha C., Neuhaus C., Pomer S., Brenner W., Schirmacher P., Störkel S., Rotter M., Masera A., Gugeler N., Decker H.J. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res*. 2000. Vol. 60. P. 1942–1948.
9. Kondo K., Yao M., Yoshida M., Kishida T., Shuin T., Miura T. et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinico-pathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002. Vol. 34. P. 58–68.
10. Piopoulous O., Kibel A., Gray S., Kaelin WG Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med*. 1995. Vol. 1. P. 822–826.

11. Chen F., Kishida T., Duh F.M., Renbaum P., Orcutt M.L., Schmidt L., Zbar B. Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 1995. Vol. 55. P. 4804–4807.
12. Wykoff C.C., Beasley N.J., Watson P.H., Turner K.J., Pastorek J., Sibtain A., Wilson G.D., Turley H., Talks K.L., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Harris A.L. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000. Vol. 60. P. 7075–7083.
13. Wiesener M.S., Munchenhagen P.M., Berger I., Morgan N.V., Roigas J., Schwiertz A., Jürgensen J.S., Gruber G., Maxwell P.H., Löning S.A., Frei U., Maher E.R., Gröne H.J., Eckardt K.U. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 2001. Vol. 61. P. 5215–5222.
14. Tsuchiya H., Iseda T., Hino O. Identification of a novel protein (VBP-1) binding to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene product. *Cancer Res.* 1996. Vol. 56. P. 2881–2885.
15. Ohh M., Yauch R.L., Lonergan K.M., Whaley J.M., Stemmer-Rachamimov A.O., Louis D.N., Gavin B.J., Kley N., Kaelin W.G.Jr, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell.* 1998. Vol. 1. P. 959–968.
16. Okuda H., Hirai S., Takaki Y., Kamada M., Baba M., Sakai N., Kishida T., Kaneko S., Yao M., Ohno S., Shuin T. Direct interaction of the beta-domain of VHL tumor suppressor protein with the regulatory domain of atypical PKC isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 263. P. 491–499. doi: 10.1006/bbrc.1999.1347.
17. Cohen H.T., Zhou M., Welsh A.M., Zarghamee S., Scholz H., Mukhopadhyay D., Kishida T., Zbar B., Knebelmann B., Sukhatme V.P. An important von Hippel-Lindau tumor suppressor domain mediates Sp1-binding and self-association. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 266. P. 43–50. doi: 10.1006/bbrc.1999.1767.
18. Yao M., Yoshida M., Kishida T., Nakaigawa N., Baba M., Kobayashi K., Miura T., Moriyama M., Nagashima Y., Nakatani Y., Kubota Y., Kondo K. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2002. Vol. 94. P. 1569–1575.
19. Druck T., Kastury K., Hadaczek P., Podolski J., Toloczko A., Sikorski A., Ohta M., LaForgia S., Lasota J., McCue P., Lubinski J., Huebner K. Loss of heterozygosity at the familial RCC t(3;8) locus in most clear cell renal. *Cancer Res.* 1995. Vol. 55. P. 5348–5353.
20. Hadaczek P., Podolski J., Toloczko A., Kurzawski G., Sikorski A., Rabbitts P., Huebner K., Lubinski J. Accumulation of losses at 3p common deletion sites is characteristic of clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Arch.* 1996. Vol. 429. P. 37–42.
21. Kim W.Y., Kaelin W.G. Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer. *Journal of clinical oncology.* 2004. Vol. 22. P. 4911–5004. doi: 10.1200/JCO.2004.05.061.
22. Hamano K., Esumi M., Igarashi H., Chino K., Mochida J., Ishida H., Okada K. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *J Urol.* 2002. Vol. 167. P. 713–717.
23. Cheng L., Zhang S., MacLennan G.T., Lopez-Beltran A., Montironi R. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* 2009. Vol. 40. P. 10–29. doi: 10.1016/j.humpath.2008.09.009.

**ONYSHCHENKO K. V.<sup>1</sup>, GRYGORENKO V. M.<sup>2</sup>, PERETA L. V.<sup>2</sup>, SERBAI Yu. R.<sup>1</sup>, VOITSITSKYI T. V.<sup>1</sup>, SKRYPKINA I. Ya.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: i.skrypkina@imbg.org.ua*

<sup>2</sup> *Institute of Urology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine, 04053, Kyiv, Yu. Kotsubinskogo str., 9-A*

## **GENETIC AND EPIGENETIC ALTERATIONS OF VHL GENE IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA**

**Aim.** Renal cell carcinomas (RCC) – cancerous neoplasms of the genitourinary system representing about 3% of human malignant tumors. For malignancy degree indexing and tumor typing, shape of cell nucleus is widely used. However, genetic changes, in particular inactivation of von Hippel-Lindau (VHL) gene can serve as indicators of RCC progression. Thus, the purpose of our study was establishing the methylation status and loss of heterozygosity of the VHL gene as a potential and applicable clinical marker of kidney tumors. **Methods.** Determination of allelic imbalance in VHL gene expression was performed by PCR of STR-markers with subsequent fragments separation in 8% PAAG and by capillary gel electrophoresis of fluorescent-labeled PCR fragments. Methyl-specific PCR was used for epigenetic variability of VHL gene promoter. To detect statistically significant differences between tumor specimens and adjacent kidney tissues, Fisher's exact test and Mann-Whitney U-criterion were applied. **Results.** In 57% of the tumor samples for the marker D3S1038 and 48% for the D3S1317 loss of heterozygosity of the VHL gene was detected. Polymorphic information content for these loci was 84% for D3S1038 and 90% for D3S1317. The VHL promoter hypermethylation was 77%. **Conclusions.** The obtained results indicate that VHL gene can be reviewed as a candidate for not only diagnostic, but also prognostic application in RCC cancer.

**Keywords:** clear cell renal cell carcinoma, epigenetic changes, methylation, loss of heterozygosity, VHL.