

ДУБРОВСЬКА Г.В.<sup>1</sup>, ОНИЩЕНКО К.В.<sup>1</sup>, ПЕРЕТА Л.В.<sup>2</sup>, КАШПАРОВА О.В.<sup>1</sup>, ГРИГОРЕНКО В.М.<sup>2</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, e-mail: dubrovskaya@univ.net.ua

<sup>2</sup> ДУ «Інститут урології НАМН України»,

Україна, 04053, м. Київ, вул. Ю. Коцюбинського, 9-А, e-mail: grygorenkosl@gmail.com

✉ i.skrypkina@imbg.org.ua, +38 (044) 526-34-98

## МІКРОСАТЕЛІТНІ ЗМІНИ ТА МЕТИЛУВАННЯ ГЕНА *RASSF1* У ХВОРИХ НА НИРКОВО-КЛІТИННИЙ РАК

**Мета.** Все більшої актуальності набуває вивчення молекулярно-генетичних змін, що зумовлюють злоякісну трансформацію клітин і визначають біологічну поведінку пухлин як перспективних діагностичних і прогностичних маркерів. Метою дослідження було визначення статусу метилування і втрати гетерозиготності гена *RASSF1A* в злоякісних пухлинах нирки та оцінка можливості його застосування як клінічного маркера. **Методи.** Визначення алельного дисбалансу в локусі гена *RASSF1* виконували з використанням високополіморфних маркерів D3S966, D3S1568 для раку нирки (РН) в парних зразках пухлинної і умовно нормальної тканини методом ПЛР, з подальшою детекцією продуктів ПЛР у поліакриламідному гелі. Епігенетичну мінливість промотора гена *RASSF1A* визначали за допомогою метил-специфічної ПЛР, для чого попередньо проводили бісульфітну обробку ДНК. Статистичну значущість відмінностей між досліджуваними групами аналізували за допомогою точного критерію Фішера та U-критерію. **Результати.** Проведені дослідження показали прогностичну значущість інактивації *RASSF1A* за РН. Ступінь метилування геномної ДНК гена *RASSF1A* склав 72%, а втрата гетерозиготності – близько 35,4%. **Висновки.** Отримані результати можуть свідчити про те, що ген *RASSF1* може стати кандидатом для включення в прогностичну систему клінічного перебігу цього типу раку. **Ключові слова:** рак нирки, епігенетичні зміни, метилування, втрата гетерозиготності, *RASSF1*.

Нирково-клітинний рак (НКТ) – найбільш поширена злоякісна пухлина нирки, що охоплює низку підтипів новоутворень нирки з різноманітними патогістологічними, генетичними та епігенетичними характеристиками. В 2016 році 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.

НКТ є другою за поширеністю причиною смерті у всьому світі і становить 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 засвідчують, що НКТ 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 виявлено, 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 великого числа пацієнтів через пізню діагностику, а також високу частоту виникнення рецидивів і прогресії.

Виявлення хворих на НКТ є малоефективними у зв'язку з переважно безсимптомним перебігом ранніх стадій цього захворювання. На жаль, в Україні сьогодні рання діагностика цього типу раку у пацієнтів без симптомів патології складає лише 16%. Водночас цей тип раку виліковний у більш ніж 90% випадків, якщо діагноз поставлений на ранній стадії. Тому вкрай важливо розробити методи ранньої діагностики

© ДУБРОВСЬКА Г.В., ОНИЩЕНКО К.В., ПЕРЕТА Л.В., КАШПАРОВА О.В., ГРИГОРЕНКО В.М., СКРИПКІНА І.Я.

НКТ, 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 високоспецифічною та більш ефективною.

Рак завжди пов'язаний із 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 НКТ пов'язаний із низкою змін у багатьох генах-супресорах, які можуть інактивуватися в результаті мутацій, протяжних алельних 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-супресора пухлинного росту може призвести до припинення його експресії, сприяючи ініціації та прогресії пухлини.

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

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

Ген *RASSF1* (Ras association domain family 1) розташований на довгому плечі хромосоми 3 (локус 3p21.3) та має вісім екзонів (1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\alpha\beta$ , 2 $\gamma$ , 3, 4, 5, та 6). *RASSF1* – досить добре вивчений онкосупресор, який може впливати на клітинний цикл, динаміку тубуліну, апоптоз та стабілізацію мікротрубочок [11]. Існує 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 гіперметилу-

вання 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* із використанням високополіморфних маркерів D3S966 та D3S1568.

Ця 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 із розвитком онкологічних хвороб, зокрема РН.

### Матеріали і методи

Групу обстеження склали 50 хворих із верифікованим діагнозом рак нирки, у яких зі зразків пухлин та умовно здорових тканин була виділена геномна ДНК (табл. 1). Розчин та реактиви для виділення геномної ДНК: «Gene Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit» («Sigma», США).

Таблиця 1. Медичні дані пацієнтів із раком нирки, зразки яких використовували в роботі

Хворі на НКТ	
Параметри	Кількість пацієнтів
Вік >55	33 (66 %)
Вік <55	17 (33 %)
Ч/Ж	32/18 (64 % / 36 %)
стадія 1-2	44 (88 %)
стадія 3-4	6 (12 %)
T <sub>1a+b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0-1</sub>	28 (56 %)
T <sub>2 a+b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	13 (26 %)
T <sub>3 a+b</sub> N <sub>0-1</sub> M <sub>0-1</sub>	9 (18 %)

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 складалася з 300 нг геномної 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 за наступних умов: денатурація – +96°C, 1 хв. (у першому циклі –

4 хв.); реасоціація праймерів протягом 1 хв за відповідних температур (табл. 2), синтез – +72°C; 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 1хТВЕ буфері (0,02 М ЕДТА, 1 М тріс, 1 М борна кислота, рН 8,3). Для приготування ПААГ брали 6,665 мл 30% акриламиду, 2,5 мл 10хТВЕ, 200 мкл 10хПСА (персульфат 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 бісульфитну обробку ДНК з використанням набору EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США).

Реакцію проводили, використовуючи такі послідовності праймерів: F 5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3' та R 5'-AACCCGCGAACAATAAAACGA-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 такими 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. Усього 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%-ому агарозному гелі та візуалізували шляхом фарбування бромистим етидієм із подальшою документаці-

єю 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 значущість відмінностей між досліджуваними групами аналізували за допомогою точного критерію Фішера та U-критерію. Відмінності вважалися статистично значущими за  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Детекцію мікросателітних змін проводили 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 із РН та навколишньої умовно здорової тканини, взятої не менше 1,5 см від місця ураження. Мікросателітний аналіз був проведений для 50 пацієнтів і передбачав 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 із 47), за маркером D3S1568 – 20,5% (9 із 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 цього пацієнта з раком нирки, що портебуватиме додаткового післяопераційного лікування.

Таблиця 2. Умови проведення ПЛР для мікросателітного аналізу

Маркер	Т °C	Послідовність праймерів	Розмір (п. н.)
D39S966 [13]	58 °C	F 5' – TACCTCCTCACRGTTTCATATTAG – 3'	120
		R 5' – CACATAGTATGTTCTCGGCTAAGAG – 3'	
D3S1568 [14]	60 °C	F 5' – CCATGAACAGAACCCTCCCTA – 3'	284
		R 5' – CCGCTGTCCTGCTGTAAG – 3'	

**Висновки**

Отже, в результаті проведених досліджень із виявлення структурних та епігенетичних змін гена *RASSF1* (втрата гетерозиготності та метилування промотора) у пухлинах РН отримані дані, які свідчать про те, що висока частота інактивзації *RASSF1* як за допомогою LOH (35,4%), так і за допомогою метилування (72%), що спостерігається за цього типу онкологічного захворювання, може бути використана у пода-

льшому для створення тест-системи ранньої неінвазивної діагностики карциноми нирки на позаклітинних ДНК плазми крові.

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

**Література**

- Cohen H.T., McGovern F.J. Renal-cell carcinoma. *N Engl. J. Med.* 2005. Vol. 353, № 23. P. 2477–2490. doi: 10.1056/NEJMra043172.
- Lam J.S., Leppert J.T., Belldregun A.S., Figlin R.A. Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World J. Urol.* 2005. Vol. 23, № 3. P. 202–212. doi: 10.1007/s00345-004-0466-0.
- National Health Service (England) NHS. URL: <http://www.nhs.uk/conditions/Cancer-of-the-kidney/Pages/Introduction.aspx> (дата звернення: 22.05.2017).
- Lujambio A., Calin G.A., Villanueva A., Ropero S., Sánchez-Céspedes M., Blanco D., Montuenga L. M., Rossi S., Nicoloso M.S., Faller W.J., Gallagher W.M., Eccles S.A., Croce C.M., Estellera M.A. microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 36. P. 13556–13561. doi: 10.1073/pnas.0803055105.
- Sandeep N. Shah, Suzanne E. Hile Kristin A. Eckert. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 2. P. 431–435. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3049.
- Kawakami K., Minamoto T. DNA methylation and cancer metastasis. *Gan. to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy.* 2010. Vol. 37 (11). P. 2042–2046. doi: 10.1186/bcr2121.
- Kristensen L.S., Hansen L.L. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem.* 2009. Vol. 55 (8). P. 1471–1483. doi: 10.1373/clinchem.2008.121962.
- Zambrano N.R., Lubensky I.A., Merino M.J., Linehan W.M., McClellan M.W. Histopathology and molecular genetics of renal tumors: toward unification of a classification system. *J. Urol.* 1999. № 163. P. 1246–1258. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68259-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68259-6).
- Rini B.I., Campbell S.C., Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet.* 2009. Vol. 373, № 9669. P. 111–1132. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60229-4.
- Katz M.E., McCormick F. Signal transduction from multiple Ras effects. *Current Opinion in Genetics & Development.* 1997. Vol. 7, № 1. P. 75–79. doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80112-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80112-8).
- Liu L., Tommasi S., Lee D.H., Dammann R., Pfeifer G.P. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene.* 2003. Vol. 22, № 50. P. 8125–8136. doi: 10.1038/sj.onc.1206984.
- Dammann R., Li C., Yoon J.H., Chin P.L., Bates S., Pfeifer G.P. Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 2000. Vol. 25, № 3. P. 315–319. doi: 10.1038/77083.
- Yamamoto N., Kuroiwa T., Katakura A., Shibahara T., Choudhury C. Loss of Heterozygosity (LOH) on Chromosome 2q, 3p and 21q in Indian Oral Squamous Cell Carcinoma. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2007. Vol. 48, № 3. P. 109–117. doi: <https://doi.org/10.2209/tdcpublication.48.109>.
- Trimeche M., Braham H., Ziadi S., Amara K., Hachana M., Korbi S. 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. *Oral Oncology.* 2008. Vol. 44. P. 755–783. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.10.001.

**DUBROVSKA H.V.<sup>1</sup>, ONYSHCHENKO K.V.<sup>1</sup>, PERETA L.V.<sup>2</sup>, KASHPAROVA O.V.<sup>1</sup>, GRYGORENKO V.M.<sup>2</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: dubrovskaya@univ.net.ua*

<sup>2</sup>*Institute of Urology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine, 04053, Kyiv, Yu. Kotsubinskogo str., 9-A, e-mail: grygorenkosl@gmail.com*

**MICROSATELLITE ALTERATION AND METYLATION OF RASSF1 GENE IN RENAL CELL CARCINOMA**

**Aim.** 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. **Methods.** 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 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. **Results.** 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 %. **Conclusions.** 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*.