

Ассоциация полиморфного варианта сайта связывания микроРНК *rs10491534* гена *TSC1* с тяжестью течения рака почки

Климентова Е.А.^{1*}, Гилязова И.Р.¹, Кунсбаева Г.Б.³, Измайлов А.А.², Султанов И.М.², Павлов В.Н.², Хуснутдинова Э.К.^{1,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН; * lissa987@yandex.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный медицинский университет

³ — Башкирский государственный университет, Уфа, РФ

Актуальность. Почечно-клеточная карцинома (ПКК) — злокачественное новообразование почки, на долю которого приходится примерно 3% всех онкологических заболеваний. Недавние исследования показали важную роль микроРНК в возникновении и прогрессии онкологических заболеваний. Мы предположили, что генетический полиморфизм сайтов связывания микроРНК может быть ассоциирован с риском развития ПКК. **Цель исследования.** Поиск ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК *rs6773576* гена *CDCP1*, *rs10982724* гена *DEC1*, *rs10491534* гена *TSC1*, являющихся участниками VHL-HIF1 α пути, с риском развития ПКК и тяжестью их течения. **Материалы и методы.** В работе исследовано 255 образцов ДНК больных раком почки и 298 образцов ДНК здоровых индивидов. Генотипирование полиморфных локусов проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. **Результаты.** Выявлено, что аллель *rs10491534**C является маркером тяжелого течения рака почки ($p = 0,044$; OR = 1,72 (CI = 1,012–2,911)). Также обнаружено, что генотип *rs10491534**T/T ($p = 0,044$; OR = 0,55; (95%CI = 0,31–0,98)) является протективным маркером в отношении развития ПКК тяжелого течения. Показана наиболее значимая ассоциация локуса *rs10491534* гена *TSC1* с тяжестью течения заболевания в доминантной модели ($p = 0,03$ (*C/T+*C/C vs *T/T), OR = 1,82 (95%CI = 1,05–3,15)). **Выводы.** Обнаруженные маркеры могут быть перспективными для прогноза течения рака почки.

Ключевые слова: VHL-HIF1 α путь; почечно-клеточная карцинома; полиморфизм в сайтах связывания микроРНК

Association of microRNA target site polymorphism *rs10491534* of the *TSC1* gene with severity renal cell carcinoma

Klimentova E.A.^{1*}, Gilyazova I.R.¹, Kunsbaeva G.B.³, Izmailov A.A.², Sultanov I.M.², Pavlov V.N.², Khusnutdinova E.K.^{1,3}

¹ — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre, RAS; * lissa987@yandex.ru

² — Bashkir State Medical University

³ — Bashkir State University

Timeliness. Renal cell carcinoma (RCC) is a malignant neoplasm of the kidney which accounts for about 3% of all cancers. Recent studies have shown the important role of miRNAs in the occurrence and progression of cancer. We hypothesized that genetic polymorphisms of microRNA binding sites may be associated with RCC risk. **Aim of investigation.** Search for associations of polymorphic variants of miRNA binding sites *rs6773576* *CDCP1* gene, *rs10982724* *DEC1* gene, *rs10491534* *TSC1* gene with the risk of renal cell carcinoma, and the severity of the disease. **Methods.** We studied 255 DNA samples from 255 RCC patients and 298 controls. Genotyping of polymorphic loci was performed by real time PCR using TaqMan-competing probes. **Results.** We found allele *rs10491534**C to be a marker of severe renal cell carcinoma ($p = 0.044$; OR = 1.72 (CI = 1.012–2.911)). Genotype *rs10491534**T/T ($p = 0.044$; OR = 0.55; (95% CI = 0.31–0.98)) — protective marker against severe RCC. The most significant association of *rs10491534* in *TSC1* gene with the severity of the disease was found in the dominant model: the combination of genotypes *C/T+*C/C vs *T/T ($p = 0,03$; OR = 1.82 (95% CI = 1.05–3.15)). **Conclusions.** The revealed markers of RCC severity may be promising for the prognosis of the RCC.

Key words: VHL-HIF1 α pathway; renal cell carcinoma; microRNA binding site polymorphism

Введение

Почечно-клеточная карцинома (ПКК) представляет собой злокачественное новообразование почки, на долю которого приходится примерно 3% всех онкологических заболеваний. Известно, что ключевую роль в развитии

ПКК играет VHL-HIF1 α путь. На сегодняшний день накоплен ряд убедительных доказательств того, что микроРНК принимают участие в различных биологических процессах, таких, как пролиферация и дифференциация клеток и апоптоз [1]. МикроРНК — короткие некодирующие РНК длиной 18–25 нуклеотидов, которые взаи-

модействуют по комплементарному принципу с 3'-не-транслируемыми областями мРНК-мишеней. Это взаимодействие в соответствующих сайтах связывания инициирует деградацию мРНК или препятствует ее трансляции [2]. Изменение характера связи микроРНК с сайтом связывания в результате однонуклеотидной замены может способствовать изменению экспрессии генов-мишеней, задействованных в возникновении и развитии опухолей.

Целью настоящего исследования является поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов VHL-HIF1 α пути (*CDCP1 rs6773576*, *TSC1 rs10491534* и *DEC1 rs10982724*), расположенных в сайтах связывания микроРНК, с риском развития почечно-клеточных карцином и тяжестью их течения.

Материалы и методы

В работе было исследовано 225 образцов ДНК, выделенных из периферической крови пациентов с установленным диагнозом *рак почки*. По этнической принадлежности пациенты распределились следующим образом: 13% башкир (31/225), 51% русских (115/225), 36% татар (79/225). Контрольная группа была сформирована из 298 здоровых неродственных жителей Республики Башкортостан, не имеющих злокачественных новообразований, которые по возрасту, полу, этнической принадлежности (29% русские, 51% татары, 20% башкиры) и территории проживания соответствовали группе больных. В группе пациентов 56% имели начальные стадии заболевания (I–II стадии злокачественного процесса по TNM-классификации) и 44% — поздние (III–IV) стадии заболевания.

Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Определение генотипов осуществляли с применением технологии Taq-man методом ПЦР в реальном времени на приборе Bio-Rad CFX96.

Результаты

Проведенный сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs6773576* гена *CDCP1* и *rs10982724* гена *DEC1* между группой больных ПКК и контрольной группой здоровых индивидов с учетом их этнической принадлежности и тяжести течения заболевания, не выявил статистически значимых результатов ($p > 0,05$). Ни для одной из этнических групп не выявлено ассоциации *rs10491534* гена *TSC1* с риском развития ПКК ($p > 0,05$). При сравнении группы больных с учетом тяжести течения заболевания нами выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей полиморфного локуса *rs10491534* гена *TSC1*. Аллель *rs10491534*C* встречался в группе больных с тяжелым течением заболевания в 36,5% случаев, тогда как в контрольной группе в 9,4% случаев (таблица). Выявлено, что аллель *rs10491534*C* является маркером тяжелого течения рака почки ($p = 0,044$; OR = 1,72 (CI = 1,012–2,911)). Кроме того, обнаружено, что генотип *rs10491534*T/T* ($p = 0,044$; OR = 0,55; (95%CI = 0,31–0,98)) гена *TSC1* являлся протективным маркером в отношении развития ПКК тяжелого течения. Дальнейший анализ с использованием различных моделей показал наиболее значимую ассоциацию локуса *rs10491534* гена *TSC1* с тяжестью течения заболевания в доминантной модели (*C/T+*C/C против *T/T) ($p = 0,03$, OR = 1,82 (95%CI = 1,05–3,15)).

Таблица

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs10491534* гена *TSC1* у больных раком почки и здоровых жителей Республики Башкортостан с учётом тяжести течения заболевания

Генотип, аллель	Пациенты с тяжелым течением заболевания		Пациенты с легким и среднетяжелым течением заболевания		Контрольная группа здоровых индивидов	
	n_i	$p_i \pm s_p, CI\%$	n_i	$p_i \pm s_p, CI\%$	n_i	$p_i \pm s_p, CI\%$
C/C	1	1,1 \pm 1,12 (0,03-6,1)	0	0	1	0,4 \pm 0,36 (0,01-2)
C/T	25	28,2 \pm 4,76 (19,07-38,62)	20	15,9 \pm 3,26 (9,97-23,44)	50	18,1 \pm 2,32 (13,76-23,18)
T/T	63	70,8 \pm 4,82 (60,19-79,95)	106	84,1 \pm 3,26 (76,56-90,03)	225	81,5 \pm 2,34 (76,43-85,92)
N	89		126		276	
C	63	36,52 \pm 3,61 (29,44-44,05)	20	7,94 \pm 1,7 (4,92-11,99)	52	9,42 \pm 1,24 (7,12-12,17)
T	113	63,48 \pm 3,61 (55,95-70,56)	232	92,06 \pm 1,7 (88,01-95,08)	500	90,58 \pm 1,24 (87,83-92,88)

Примечание. n_i — численность групп; N — объем выборки; p_i — частота генотипа (аллеля); s_p — ошибка p_i ; CI% — 95% доверительный интервал

Обсуждение

TSC1 — ген, кодирующий белок туберозного склероза, который подавляет рост и пролиферацию клеток [3]. Известно, что при метастатическом раке почки ответ на терапию зависит от наличия мутации в этом гене [4]. В исследовании Wei H. с соавторами не обнаружено статистически значимых ассоциаций полиморфного варианта *rs10491534* с риском развития ПКК [5].

Ген *CDCP1*, экспрессия которого часто повышена при различных типах рака, способствует метастазированию и инвазии опухоли. В нескольких исследованиях было обнаружено, что повышение уровня экспрессии *CDCP1* коррелирует со снижением общей выживаемости пациентов с почечно-клеточной карциномой [6, 7]. Ген *DEC1* участвует в формировании аксонов, регуляции дифференцировки клеток и развитии опухоли. Показано, что в условиях гипоксии наблюдается повышение экспрессии гена *DEC1*, что может быть непосредственно связано с развитием гипоксией-индуцированных опухолей [8], таких, как рак легкого, поджелудочной железы, мочевого пузыря и почки [9]. Известно, что полиморфные варианты *rs6773576* гена *CDCP1* и *rs10982724* гена *DEC1* ассоциированы с повышением риска развития ПКК [5].

В настоящее время появляется больше доказательств того, что мутации в сайтах связывания микроРНК могут обуславливать предрасположенность к развитию рака почки и тяжесть течения заболевания. Несмотря на то, что SNPs сайтов связывания микроРНК при раке почки еще крайне мало изучены, полученные в результате настоящего исследования данные свидетельствуют об ассоциации *rs10491534* гена *TSC1* с тяжестью течения злокачественных новообразований почки. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования изученных генов для установления их функциональной значимости и роли в патогенезе злокачественных новообразований почки.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-97083.

Список литературы

1. Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L et al. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(13):4535-41.
2. Аушев ВН МикроРНК: малые молекулы с большим значением Клиническая онкогематология 2015; 8(1): 1-12
3. Thien A, Prentzell MT, Holzwarth B et al. TSC1 activates TGF- β -Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Cell.* 2015 Mar 9;32(5):617-30.
4. Kwiatkowski DJ, Choueiri TK, Fay AP et al. Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR Are Associated with Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 1.
5. Wei H, Ke HL, Lin J et al. MicroRNA target site polymorphisms in the VHL-HIF1 α pathway predict renal cell carcinoma risk *Mol Carcinog.* 2014 Jan;53(1):1-7.
6. Awakura Y, Nakamura E, Takahashi T et al. Microarray-based identification of CUB-domain containing protein 1 as a potential prognostic marker in conventional renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(12):1363-9.
7. Mamat S, Ikeda J, Enomoto T et al. Prognostic significance of CUB domain containing protein expression in endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 2010 May;23(5):1221-7.
8. Ma W, Shi X, Lu S, Wu L, Wang Y. Hypoxia-induced overexpression of DEC1 is regulated by HIF-1 α in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2013;30(6):2957-62.
9. Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene.* 2000;19(54):6297-305.