УДК 616.65-006.6-07

ІДЕНТИФІКАЦІЯ НОВИХ ДІАГНОСТИЧНИХ МАРКЕРІВ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ NOTI–МІКРОЧИПІВ

С. О. Возіанов, В. І. Кашуба, В. М. Григоренко, В. В. Гордіюк, Р. О. Данилець, Ю. М. Бондаренко, М. В. Вікарчук

Інститут урології НАМН України,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ

IDENTIFICATION OF A NEW DIAGNOSTIC MARKERS OF PROSTATIC CANCER, USING NOTI–MICROCHIPS

S. O. Vozianov, V. I. Kashuba, V. M. Grygorenko, V. V. Gordiyuk, R. O. Danylets, Yu. M. Bondarenko, M. V. Vikarchuk

Institute of Urology NAMS of Ukraine,
Institute Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv

Реферат

Досліджені зразки біопсійного матеріалу 33 хворих, обстежених з приводу припущення про наявність раку передміхурової залози (РПЗ). За даними морфологічного дослідження, у 15 хворих верифіковано доброякісну гіперплазію (ДГ) передміхурової залози (ПЗ), у 18 – аденокарциному ПЗ. Для визначення епігенетичних змін застосовували NotI–мікрочіпи 180 клонів 3–ї хромосоми. У 50 генах 3–ї хромосоми відзначено високу частоту змін стану метилювання (від 33 до 82%). Деякі змінені гени беруть участь у канцерогенезі (HMGB1L5, LRRC58, GPR149, DZIP1L, C3orf77, NUDT16) та виникненні РПЗ (BCL6, ITGA9, FBLN2, SOX2, LRRC3B тощо). Залежність стану метилювання генів від клініко–морфологічних показників у хворих, зокрема, рівня простатспецифічного антигену (ПСА), ступеня диференціації пухлини за Глісоном, стадії РПЗ не встановлена. Ідентифікована панель з 16 нових потенційних маркерів для ранньої та диференційної діагностики РПЗ: BHLHE40, FOXP1, LOC285205, ITGA9, CTDSPL, FGF12, LOC440944/SETD5, VHL, CLCN2, OSBPL10/ZNF860, LMCD1, FAM19A4, CAND2, MAP4, KY та LRRC58.

Ключові слова: рак передміхурової залози; епігенетичні маркери; метилювання.

Abstract

The biopsy material specimens were investigated in 33 patients, examined for the prostatic cancer suspicion. In accordance to the morphological investigation data, in 15 patients a benign prostatic hyperplasia was verified, and in 18 – pancreatic adenocarcinoma. NotI–microchips of 180 clones of the third chromosome were used for determination of epigenetic changes. In 50 genes of the third chromosome a high rate of the methylation state changes (from 33 to 82%) was noted. Some changed genes take part in cancerogenesis (HMGB1L5, LRRC58, GPR149, DZIP1L, C3orf77, NUDT16) and in the prostatic gland cancer occurrence (BCL6, ITGA9, FBLN2, SOX2, LRRC3B etc.). Dependence of the genes methylation state from the clinic–morphological indices in patients with the prostatic gland cancer, including, the prostate–specific antigen level, the tumor differentiation degree in accordance to Gleason, was not established. Panel, consisting of 16 new potential markers for early and differentiated diagnosis of prostatic gland cancer, was identified: BHLHE40, FOXP1, LOC285205, ITGA9, CTDSPL, FGF12, LOC440944/SETD5, VHL, CLCN2, OSBPL10/ZNF860, LMCD1, FAM19A4, CAND2, MAP4, KY and LRRC58.

Key words: prostatic gland cancer; epigenetic markers; methylation.

За даними статистики, в структурі онкологічних захворювань у світі РПЗ посідає друге місце за поширенням та п'яте – за смертністю [1]. Впровадження в клінічну практику методу визначення рівня ПСА дозволило значно покращити діагностику РПЗ на ранніх стадіях, збільшити частоту виконання радикального втручання [2]. Проте, суттєвою проблемою є хибно позитивні результати, що змушує проводити непотрібну біопсію ПЗ, тому доцільність застосування ПСА як маркера скринінгу РПЗ сумнівна [3]. В той же час, за даними деяких дослідників, існує потенційний ризик гіпердіагностики клінічно незначущого РПЗ, лікування якого зумовлює виникнення ускладнень, що потребують великої уваги і витрат [4]. Це спричинило дискусію щодо користі ранньої діагностики РПЗ й аргументів проти скринінгу.

Така ситуація свідчить про необхідність пошуку маркерів для визначення агресивності РПЗ, які дозволили б уникнути неадекватного лікування, більш ефективно й персоніфіковано підходити до лікування хворих. Визначені численні потенційні маркери РПЗ у сироватці крові, сечі, сім'яній рідині та тканині пухлини.

Наявність загального механізму епігенетичних розладів (гіперметилювання CpG–острівців промоторів, генів–супресорів росту пухлин, гіпометилювання онкогенів) є підставою для пошуку потенційних маркерів РПЗ з огляду на зміни метилювання промоторів цих генів [5]. Аргументами на користь використання біомаркерів на основі аналізу стану метилювання промоторів генів та виявлення делеції є висока стабільність ДНК, наявність ефективної технології для масштабного пошуку відповідних змін, можливість виявлення метилювання генів у рідинах організму: крові, сечі, слині тощо [6]. Мультигенні дослідження

важливі для розвитку сучасних прогностичних і діагностичних методів. Порушення генів 3–ї хромосоми часто спричиняє формування пухлин епітеліального походження [7]. На короткому плечі 3–ї хромосоми містяться групи генів – супресорів росту пухлин, інактивація яких можлива внаслідок метилювання промоторів або делеції, вони можуть бути використані як онкомаркери [8]. Більшість Not–сайтів локалізовані в ділянках промоторів генів і є потенційними генетичними маркерами структурних змін хромосоми. Саме тому в дослідженні використана технологія NotI–мікрочипів, що дозволяє одночасно виявляти генетичні (делеції, ампліфікації) та епігенетичні (метилювання) зміни генів.

Мета: ідентифікація нових потенційних діагностичних епігенетичних та генетичних маркерів пухлин ПЗ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджені зразки матеріалу у 33 хворих, яким здійснена трансректальна мультифокальна біопсія під контролем ультразвукового дослідження в умовах клініки. Вік хворих на момент проведення дослідження від 51 до 74 років, у середньому (64,2 ± 4,1) року. Вихідний рівень ПСА у сироватці становив 5,1 – 44,7 нг/мл, у середньому (13,6 ± 2,9) нг/мл, в тому числі 10 нг/мл і менше – у 16 (48,5%), 10,1 – 19,9 нг/мл – в 11 (33,3%), 20 нг/мл і більше – у 6 (18,2%).

За даними морфологічного дослідження, у 15 хворих верифіковано ДГПЗ, у 18 – аденокарциному ПЗ. За встановленого діагнозу РПЗ середнє значення ступеня диференціації аденокарциноми за Глісоном становило (6,7 ± 0,5) бала, 6 балів і менше – у 8 (44,4%), 7 балів – у 6 (33,3%), 8 балів і більше – у 4 (22,2%). РПЗ I клінічної стадії (T1N0M0) встановлена у 3 (16,7%) хворих, II стадії (T2N0M0) – у 9 (50%), III стадії (T3N0M0) – у 4 (22,2%), IV стадії (T3–4N0M0–1) – у 2 (11,1%).

Як контрольні використані 4 зразки тканини ПЗ, в яких за результатами морфологічного дослідження верифікований хронічний простатит.

Геномну ДНК виділяли шляхом екстракції хлороформ–фенолом за протоколом за Маніатисом [9]. Екстракцію тотальної РНК здійснено з використанням RNeasy Mini kit (Qiagen, Німеччина) за рекомендаціями виробника. Якість РНК контролювали за допомогою спектрофотометра (NanoDrop Technologies Inc., США) та з використанням RNA integrity number (RIN; Agilent Technologies, США); кДНК синтезували за допомогою Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) і відповідних праймерів.

Для аналізу з використанням NotI –мікрочипів відібрані 180 клонів 3–ї хромосоми людини. NotI–проби отримані за технологією, наведеною раніше [10]. Гібридизацію зразків проводили при температурі 42°C протягом 15 год на приладі Lucidea Base device (Amersham Pharmacia Biotech) за рекомендаціями виробника. Мікрочипи досліджували на сканері GenePix 4000A. Результати обробляли за допомогою програм GenePix Pro 6.0 software (Amersham Pharmacia Biotech) та NIMAN.

Бісульфітну обробку ДНК здійснювали за допомогою EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) за рекомендаціями виробника.

Після ампліфікації ДНК шляхом бісульфітної обробки продукти ланцюгової реакції з полімеразою (ЛРП) клоновані і використані для автоматичного секвенування (ABI Prism 3100–Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, США).

Експресію генів BHLHE40, BCL6 і ITGA9 досліджували з використанням комерційного набора праймерів (Applied Biosystems, США) і 7500 Real–Time PCR System (Applied Biosystems). Кожну реакцію проводили тричі. Результати кількісної ЛРП аналізували з використанням референтних генів GAPDH, ACTB і B2M. Якщо експресія змінювалась більше ніж удвічі, результати вважали значущими.

Для аналізу частоти метилювання та/або делеції в групах хворих з пухлинами ПЗ за різних патоморфологічних змін використані тест Фішера і критерій χ^2. Зразки за $p < 0,05$ вважали статистично значущими. Набір маркерів для ідентифікації і диференціювання ПЗ пухлин отриманий за допомогою статистичного методу векторних машин. Чутливість, специфічність і точність наборів маркерів обчислювали як пропорцію відповідно правдивих позитивних, правдивих негативних і правдивих позитивних + правдивих негативних результатів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З використанням NotI–мікрочипів досліджена геномна ДНК 15 зразків біопсій ДГПЗ та 18 зразків РПЗ. Для контролю використані зразки ДНК пацієнтів з запаленням ПЗ. Сайти рестрикції NotI (GCGGCCGC) часто локалізовані всередині промоторів генів і чутливі до обробки рестриктазою NotI, що відображає стан метилювання або наявність делеції відповідних генів. У 50 генах 3–ї хромосоми виявлено високу частоту змін стану метилювання або делеції (від 33 до 82%), що свідчило про значення порушень 3–ї хромосоми людини у виникненні РПЗ (*табл. 1*).

Відібрані 10 генів, в яких метилювання/делеція відбувались найчастіше, для аналізу залежності їх частоти від клінічних показників у хворих (рівень ПСА, ступінь диференціації за Глісоном, стадія РПЗ).

При аналізі залежності стану метилювання/делеції генів від вихідного рівня ПСА у сироватці статистично значущої різниці не було. Проте, відзначено, що у хворих при РПЗ і ПСА 20 нг/мл і більше метилювання/делецію досліджуваних генів виявляли частіше.

Встановлено, що метилювання/делецію частіше виявляли у хворих за низькодиференційованої аденокарциноми. Зокрема, у 8 з 10 генів виявлене метилювання/делеція в усіх 4 хворих, гени MANF і PLCL2 – у 3 з них за ступеня диференціації пухлини 8 балів і більше (за Глісоном).

Досліджено залежність частоти метилювання/делеції від клінічної стадії РПЗ. У хворих при РПЗ IV стадії спостерігали метилювання/де-

Таблиця 1. **Метилювання/делеція 10 NotI–сайтів за високої частоти змін при ДГПЗ і РПЗ**

NotI–сайт	Ген/локус	Локалізація	Частота метилювання/делеції			
			ДГПЗ		РПЗ	
			абс.	%	абс.	%
NR5–IH18RS	BHLHE40	3p26.1	14	93,3	15	83,3
NR1–XM13C	IQSEC1	3p25.2	11	73,3	15	83,3
NR1–AK24R	BCL6	3q27	11	73,3	15	83,3
NL1–BA6R	FOXP1	3p14.1	10	66,7	15	83,3
NR1–KJ5R (C)	FBLN2	3p25.1	11	73,3	13	72,2
NR1–EP7RS	CLASP2	3p22.3	12	80	12	66,7
NL1Z216R (D)	MANF	3p21.1	12	80	12	66,7
NL1–GK21R (C)	ROPN1/KALRN	3q13.3	9	60	15	83,3
NL4–AP18R (C)	PLCL2	3p24.3	8	53,3	16	88,9
NL1A401R (D)	ITGA9	3p21.3	9	60	14	77,8

Таблиця 2. **Маркери для раннього виявлення РПЗ, диференційної діагностики ДГПЗ і РПЗ та визначення ступеня агресивності РПЗ**

Застосування	Маркери	Специфічність, % ($\bar{x} \pm m$)	Чутливість, % ($\bar{x} \pm m$)	p<
Діагностка РПЗ, ДГПЗ та агресивного РПЗ	BHLHE40, FOXP1, LOC285205, ITGA9, RBSP3, FGF12	94 ± 4	95 ± 4	0,01
Диференційна діагностика РПЗ та ДГПЗ	FAM19A4, CAND2, MAP4, KY, LRRC58	73 ± 11	93 ± 7	0,01
Визначення ступеня агресивності РПЗ	SETD5, VHL, CLCN2, OSBL10, LMCD1	97 ± 3	100	0,01

лецію 9 з 10 відібраних генів, в 1 не було метилювання/делеції гена CLASP2. За інших стадій РПЗ статистично значущої залежності частоти метилювання/делеції маркерів не було.

Вперше доведено участь деяких генів (HMGB1L5, LRRC58, GPR149, DZIP1L, C3orf77, NUDT16), в яких виявлені зміни за результатами використання NotI–мікрочипів, у канцерогенезі. Встановлений зв'язок деяких генів (FOXP1, MANF, GATA2, ALDH1L1, EPHB3) з пухлинами ПЗ. Найбільшу групу становлять гени, асоційовані з різними пухлинами, вперше доведено їх участь у виникненні РПЗ (BCL6, ITGA9, FBLN2, SOX2, LRRC3B тощо).

В генах CTDSPL, ALDH1L1, LRRC3B, IQSEC1,FOXP1, GNAI2, EPHB1, WNT7A виявлене метилювання/делеція при раку товстого кишечнику, недрібноклітинному раку легенів, раку шийки матки, світлоклітинній карциномі нирок, серозному раку яєчників.

Для перевірки результатів використання NotI–мікрочипів (детального аналізу стану метилювання) проведене бісульфітне секвенування 3 генів/локусів FGF12, GATA2, LMCD1 і гена TESSP2 як контрольного. Ген FGF12 (fibroblast growth factor 12) зумовлює мітогенний потенціал клітин, сприяє їх виживанню. Він суттєво метильований при раку грудної залози і товстого кишечнику. З іншого боку, за плоскоклітинної карциноми легенів відзначене підвищення експресії цього гена.

Для визначення змін гена FGF12 проаналізовані 12 зразків РПЗ за ступеня диференціації за Глісоном від 4 до 9 балів. В усіх зразках виявлене метилювання NotI–сайта у 40 – 80% клонів. Високий рівень метилювання NotI–сайта (30 – 70% клонів) спостерігали також у генах GATA2 (GATA binding protein 2) и LMCD1 (LIM and cysteine–rich domains 1). В гені серинової протеази TESSP2 (негативний контроль) метилювання було майже відсутнє (менш ніж у 10% клонів). Таким чином, гіперметилювання генів є суттєвим (частим) механізмом інактивації при РПЗ.

Як приклад, в генах BHLHE40 (basic helix–loop–helix family member e40), BCL6 (B–cell CLL/lymphoma 6) і ITGA9 (інтегрин 9) виявлено високу частоту метилювання/делеції промоторів за результатами використання NotI–мікрочипів, у більшості перевірених зразків відзначене суттєве зниження рівня експресії цих генів за даними ЛРП. Таким чином, високій рівень метилювання/делеції асоційований з зниженням експресії досліджених генів.

Для виявлення пухлин ПЗ нами запропонована панель з 6 генів/локусів (BHLHE40, FOXP1, LOC285205, ITGA9, CTDSPL (RBSP3), FGF12). Ген BHLHE40 (регіон 3p26) кодує фактор транскипції і є потенційним геном–супресором росту пухлин. Ген RBSP3 (3p21.3) кодує фосфатазоподібний протеїн, важливий для активації протеїну ретинобластоми (Rb). Ген ITGA9 (3p21.3) кодує інтегрин альфа 9. Делеції в регіоні 3p14, що містить FOXP1 (forkhead box P1 protein), пов'язані з наявністю злитого гена TMPRSS2–ERG в геномі при РПЗ. Виникнення делеції може свідчити про супресорну роль гена FOXP1.

Для виявлення агресивного РПЗ нами запропонована панель з 5 генів/локусів (LOC440944/SETD5, VHL, CLCN2, OSBPL10/ZNF860, LMCD1). Ген VHL (von Hippel–Lindau tumor suppressor gene; 3p25.3) часто інактивується при світлоклітинному

раку нирок. Підвищення його рівня індукує апоптоз в клітинах ПЗ. Ген CLCN2 (3q27–q28) кодує протеїн каналів іону хлору 2. Цей ген є терапевтичною мішенню при інгібуванні злоякісної гліоми. Ген LMCD1 (LIM and cysteine–rich domains protein 1; 3p26–p24) відомий як потенційний онкоген при раку печінки. Ген OSBPL10 (oxysterol binding protein–like 10; 3p22.3) відіграє ключову роль у балансі холестерину.

Для диференційної діагностики ДГПЗ і РПЗ нами запропоновані 5 генів/локусів (FAM19A4, CAND2, MAP4, KY, LRRC58). Ген FAM19A4 (3p14.1) кодує хемокінподібний протеїн TAFA4. Метилювання FAM19A4 виявлене при раку шийки матки і грудної залози. Він є потенційним супресором росту пухлин. Ген CAND2 (cullin–associated and neddylation–dissociated 2 protein; 3p25.2) може бути регулятором транскрипції і відігравати важливу роль у формуванні убіквітин–лігазного комплексу. Ген MAP4 (microtubule–associated protein 4; 3p21) стабілізує мікротубули та контролює їх динаміку в мітозі. Щодо ролі генів KY (kyphoscoliosis peptidase; 3q22.2) і LRRC58 (leucine–rich repeat–containing protein 58; 3q13.33) у виникненні РПЗ, як і генів FAM19A4, CAND2 і MAP4, відомостей немає.

Таким чином, за результатами кластерного аналізу відібрані гени–кандидати для визначення різних стадій раку, зокрема, запропоновані 16 нових потенційних маркерів, що можуть з високою достовірністю бути використані для раннього виявлення РПЗ, диференційної діагностики ДГПЗ і РПЗ та визначення ступеня агресивності РПЗ (*табл. 2*).

Таким чином, порушення 3–ї хромосоми людини можуть бути пов'язані з виникненням пухлин ПЗ. За допомогою технології NotI–мікрочипів у 50 генах/локусах метилювання/делецію виявлено більш ніж у 30% зразків ДНК пухлин ПЗ за різних морфологічних змін. Метилювання промоторної ділянки генів FGF12, GATA2 і LMCD1 підтверджене за допомогою бісульфітного секвенування. Зміни генів BHLHE40, BCL6 і ITGA9 асоційовані з зниженням їх експресії за результатами кількісної ЛРП. Для 6 генів (HMGB1L5, LRRC58, GPR149, DZIP1L, C3orf77 і NUDT16) раніше не було відомостей про зв'язок з злоякісними новоутвореннями. Особливо важливий аналіз порушень сигнальних шляхів, в яких задіяні ці гени. Отримані нами результати свідчать про високий потенціал технології NotI–мікрочипів для пошуку генетичних і епігенетичних порушень при РПЗ. В той же час, не встановлений зв'язок ідентифікованого нами набору генетичних маркерів з клінічними показниками у хворих (рівень ПСА, ступінь диференціювання пухлини за Глісоном, стадія РПЗ), що потребує подальших досліджень з залученням додаткових маркерів.

Основний результат дослідження – визначення 16 нових потенційних маркерів для ранньої та диференційної діагностики пухлин ПЗ за різних морфологічних характеристик.

ЛІТЕРАТУРА

1. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality World wide: IARC Cancer Base No. 11 [Електронний ресурс] / J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik [et al.] // Int. Agency Res. Cancer. – Lyon, France, 2012 – Режим доступу: http://globocan.iarc.fr/.
2. Cancer statistics / A. Jemal, T. Murray, A. Samuels [et al.] // Cancer J. Clin. – 2003. – Vol. 53. – P. 5 – 26.
3. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U. S. Preventive services task force / R. Chou, J. M. Croswell, T. Dana [et al.] // Ann. Intern. Med. – 2011. – Vol. 155, N 11. – P. 762 – 771.
4. ERSPC Investigators. Screening and prostate–cancer mortality in a randomized European study / F. H. Schroder, J. Hugosson, M. J. Roobol [et al.] // New Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360, N 13. – P. 1320 – 1328.
5. Iacobuzio–Donahue C. A. Epigenetic changes in cancer / C. A. Iacobuzio–Donahue // Ann. Rev. Pathol: Mechanisms of Disease. – 2009. – Vol. 4 – P. 229 – 249.
6. Woodson K. CD44 and PTGS2 methylation are independent prognostic markers for biochemical recurrence among prostate cancer patients with clinically localized disease / K. Woodson, K. J. O'Reilly, D. E. Ward [et al.] // Epigenetics. – 2006. – Vol. 1, N 4. – P. 183 – 186.
7. Chiam K. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: current and future uses / K. Chiam, C. Ricciardelli, T. Bianco–Miotto // Cancer Letters. – 2014. – Vol. 342, N 2. – P. 248 – 256.
8. Hesson L. B. Evaluation of the 3p21.3 tumour–suppressor genecluster / L. B. Hesson, W. N. Cooper, F. Latif // Oncogene. – 2007. – Vol. 26, N 52. – P. 7283 – 7301.
9. Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory / T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook. – NY, USA: Cold Spring Harbor, 1982.
10. Identification of chromosome 3 epigenetic and genetic abnormalities and gene expression changes in ovarian cancer / V. V. Gordiyuk, G. V. Gerashchenko, I. Y. Skrypkina [et al.] // Biopolymers and Cell. – 2008. – Vol. 24, N 4. – P. 323 – 332.