

## СТАН ДНК-МЕТИЛЮВАННЯ ГЕНА ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ P1 (GSTP1) У ХВОРИХ НА РАК СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ

Глутатіон-S-трансфераза P1 (GSTP1) виконує ключову роль у процесі блокування розвитку оксидативного стресу шляхом глутатіон-SH-залежної кон'югації ксенобіотиків, мутагенів, канцерогенів та є багатофункціональним антиоксидантним ферментом, який захищає клітину від дії генотоксичних чинників та апоптозу. Зниження глутатіону є одним з ключових факторів канцерогенезу за пригнічення експресії гена *GSTP1* [1, 2].

*GSTP1* — основна ізоформа глутатіон-S-трансферази, яка експресується у всіх типах клітин людини, за винятком гепатоцитів [3]. Разом з тим, зміни в експресії гена *GSTP1* характерні для багатьох типів пухлин, причому залежно від типу пухлини спостерігається як пригнічення, так і підсилення його експресії у порівнянні з нормальними клітинами [4]. Відомо, що пригнічення експресії гена *GSTP1* пов'язується з епігенетичним механізмом, що становить значний інтерес в перебігу онкологічної прогресії [5].

5'-промоторна ділянка гена *GSTP1* характеризується наявністю CpG-острівця. Так, ділянка на проміжку від -100 до +300 bp відносно старту ініціації містить 72% C+G нуклеотидів, при цьому вміст CpG-динуклеотидів сягає 9,2%, що вказує на присутність такого CpG-острівця у промоторній ділянці гена *GSTP1*, який у нормі характеризується конститутивним ДНК гіпометилуванням CpG-динуклеотидів за активного функціонування промотору [6].

Основним механізмом епігенетичних порушень, що супроводжують прогресію сечостатевої онкопатології, такої як рак простати [6, 7] та рак нирки [8, 9], є аберантне гіперметилування CpG-промотору гена *GSTP1*. Рак простати та рак нирки — одні з розповсюджених на сьогоднішній день онкопатологій сечостатевої системи людини, тому дослідження стану метилування промотору гена *GSTP1* має бути актуальним біологічним маркером для підвищення специфічності ранньої молекулярно-генетичної діагностики даних захворювань [10, 11].

До теперішнього часу сучасні методи діагностики і прогнозування раку сечостатевої сис-

теми залишаються доволі ускладненими, з урахуванням біопсії. Пошук неінвазивних методів на зразках ДНК, виділеної з пухлино-асоційованих клітин сечі, може пов'язуватися з епігенетичним аналізом стану метилування гена *GSTP1* [11].

Метою роботи є визначення стану метилування ДНК промотору гена *GSTP1* на зразках сечі та периферійної крові хворих на рак сечостатевої системи.

### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були як зразки периферійної крові умовно здорових донорів (n = 6), так і зразки нічної сечі від хворих на рак нирки (n = 10), рак сечового міхура (n = 8) та рак простати (n = 5) з Національного інституту раку.

Виділення тотальної ДНК проводили за стандартним протоколом (безфенольний метод). Концентрацію зразків ДНК вимірювали на приладі Nanodrop 2000 (Termo Scientific, USA) та нормували до 800 нг/мкл. Проводили бісульфітну конверсію геномних ДНК за допомогою стандартного Epic JET Bisulfite Conversion Kit (Termo Scientific, Литва) відповідно до протоколу.

Для метил-специфічної ПЛР (МС-ПЛР) бісульфітно модифікованої ДНК були синтезовані метил-специфічні праймери до неметильованої ділянки промотору гена *GSTP1*: 5'-GATTTGGGAAAGAGGGAAAGG-3' (прямий) та 5'-СТАААААСТСТАААССССТСС-3' (зворотний), продуктом яких є амплікон за розміром 310 п.н. Контролем на МС-ПЛР слугував ген лужної фосфатази за використанням праймерів до неметильованої ділянки промотору:

5'-GGTAAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3' (прямий) та 5'-СССТАССАААААССААААСТ АААААС-3' (зворотний) з відповідним продуктом ампліфікації 175 п.н.

Результати МС-ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі з ТАЕ буфером (40 mM трис-ацетат; 1 mM EDTA; pH 7,6). Детекцію продуктів МС-ПЛР проводили за допомогою етидид бромідного розчину (EtBr

0,01 мг/мл) з подальшим аналізом електрофореграм за допомогою денситометрії в програмі *TotalLab v. 2.01*.

### Результати та обговорення

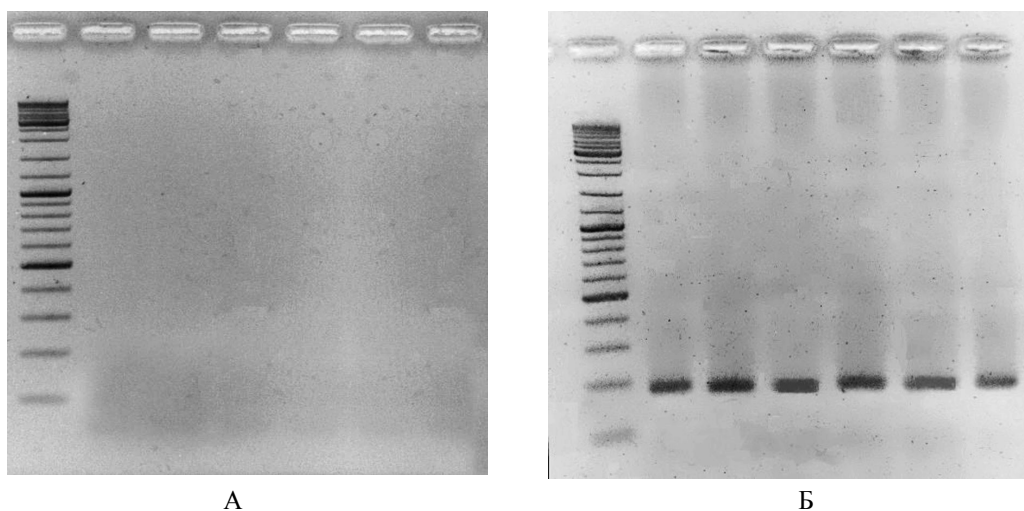
Фізіологічно, CpG-острівець, що входить до складу промотора гена *GSTP1* на проміжку від -100 до +300 bp, є неметильованим та активно транскрибується у геномі (5, 6). Ключовим механізмом репресії транскрипції гена *GSTP1* є епігенетичне аберантне ДНК-метилування його CpG-промотору (7, 10, 11). Універсальним методом аналізу епігенетичного ДНК-метилування є бісульфітна модифікація ДНК, принцип якої полягає в послідовній хімічній конверсії залишків неметильованого цитозину до урацилу у складі CpG-динуклеотидів [12].

Нами проведено дослідження стану аберантного ДНК-метилування промотору гена *GSTP1* у хворих на рак сечостатевої системи: рак нирки (n = 10), рак сечового міхура (n = 8) та рак простати (n = 5). Після бісульфітної модифікації геномних ДНК проводили метил-специфічну ПЛР (МС-ПЛР) за використання праймерів до неметильованого промотору гена *GSTP1*. Це надало нам можливість виявити чи не виявити специфічну ампліфікацію фізіологічно неметильованого стану промотору гена *GSTP1* у досліджуваних хворих на рак сечостатевої системи, як на зразках нічної сечі, так і периферійній крові.

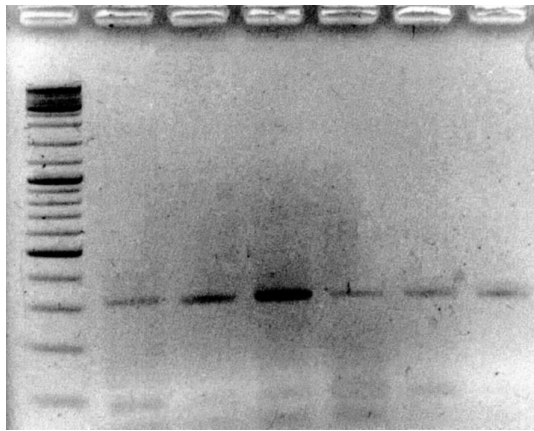
На рис. 1, А представлені результати дослідження, де показана відсутність продукту специфічної ампліфікації гена *GSTP1* (310 п.н.) у хво-

рих на рак нирки (1, 2), рак сечового міхура (3, 4) та рак простати (5, 6) на зразках нічної сечі, що вказує на аберантно метильований стан CpG-промотору гена *GSTP1* і, як наслідок, репресію його транскрипції, виявлену у таких хворих. Навпаки, вибраний нами контрольний ген лужної фосфатази (*ALPh*) не зазнавав аберантного метилування свого CpG-промотору відповідно до специфічності проведеного МС-ПЛР аналізу (рис. 1, Б).

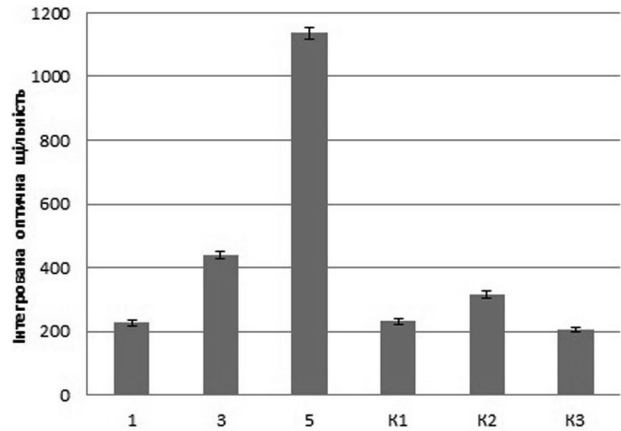
На жаль, клітинний пул сечі умовно здорових донорів був недостатнім для отримання необхідної концентрації ДНК у подальшому аналізі. Щоб показати специфічність аберантного метилування промотору гена *GSTP1* саме на зразках сечі, що містить канцер-асоційовані клітини, нами було проаналізовано зразки периферійної крові досліджуваних хворих на рак сечостатевої системи у порівнянні з фізіологічними контролями (К1, К2 — плацента, К3 — пуповинна кров). Як видно з рис. 2, А, на відміну від сечі, в лімфоцитах периферійної крові має місце продукт ампліфікації, 310 п.н., що вказує на неметильований стан промотору гена *GSTP1* у хворих на рак нирки (1), рак сечового міхура (3) та рак простати (5) у порівнянні з фізіологічними контролями (К1, К2 — плацента, К3 — пуповинна кров). Отримані результати свідчать про те, що периферійна кров імовірно не може використовуватися для діагностичного прогнозування гена *GSTP1* у хворих на рак сечостатевої системи. В той же час, можна відзначити, що у хворого під номером 5 на рак простати може мати місце персоніфіковано



**Рис. 1.** А. Стан аберантного ДНК-метилування промотору гена *GSTP1* за відсутністю продукту ампліфікації до неметильованої ділянки (310 п.н.) у хворих на рак нирки (1, 2), рак сечового міхура (3, 4) та рак простати (5, 6) на зразках нічної сечі. Б. Продукт ампліфікації до неметильованої ділянки промотору гена лужної фосфатази *ALPh* (175 п.н.) у хворих на рак нирки (1, 2), рак сечового міхура (3, 4) та рак простати (5, 6) на зразках нічної сечі



А



Б

**Рис. 2.** А. Стан ДНК-метилування промотору гена *GSTP1* за МС-ПЛР на зразках периферійної крові у хворих на рак нирки (1), рак сечового міхура (3) та рак простати (5) у порівнянні з контролем (K1, K2 — плацента, K3 — пуповинна кров). Б. Денситограма відносного рівня ампліфікації гена *GSTP1* на зразках крові пацієнтів на рак сечостатевої системи (1 — рак нирки; 3 — рак сечового міхура; 5 — рак простати) та фізіологічних контролів (K1, K2 — плацента; K3 — пуповинна кров)

вищий рівень активності системи детоксикації за рівнем транскрипції гена *GSTP1* (у 3,5 рази), порівнюючи з фізіологічним контролем (рис. 2, А).

Таким чином, як видно з рис. 2, на зразках периферійної крові досліджуваних хворих на рак сечостатевої системи, на відміну від зразків нічної сечі (рис. 1), має місце транскрипція гена *GSTP1*, який не інгібується за механізмом епігенетичного аберантного ДНК-метилування CpG-промотору. Отже, діагностичним та прогностичним об'єктом для раку сечостатевої системи за аберантним метилуванням промотору гена *GSTP1* може бути лише нічна сеча.

### Висновки

Проведено диференційний аналіз стану аберантного ДНК-метилування промотору гена *GSTP1* на зразках нічної сечі та периферійної крові за допомогою бісульфітної модифікації та метил-специфічної ПЛР у хворих на рак сечостатевої системи (нирки, сечового міхура, простати). Отримані результати можуть мати діагностичне та прогностичне значення в системі неінвазивної діагностики раку нирки, простати та сечового міхура на зразках нічної сечі.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Guoyao W. Glutathione metabolism and its implication for health // *The journal of nutrition*.— 2004.— 134 (3).— P. 489–492.
2. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.— 2005.— 45.— P. 51–88.
3. Eaton D. L. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology // *Toxicological sciences*.— 2007.— 49.— P. 156–164.
4. Слончак А. М., Оболенська М. Ю. Структура і функції глутатіон-S-трансферази P1 // *Український біологічний журнал*.— 2009.— 1.— С. 5–13.
5. Millar D. S., Ow2 K. K., Paul C. L., Russell P. J., Molloy P. L., Clark S. J. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase p (*GSTP1*) gene in prostate cancer // *Oncogene*.— 1999.— 18.— P. 1313–1324.
6. Bernardini S., Miano R., Iori R., Finazzi-Agro E., Palmieri G., Ballerini S., Angeloni C., Orlandi A., Bellincampi L., Cortese C., Federici G. Hypermethylation of the CpG in the promotor region of the *GSTP* gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker // *Clin Chim Acta*.— 2004.— 350 (1–2).— P. 181–188.
7. Bastian P. J., Ellinger J., Schmidt D., Wernert N., Wellmann A., Müller S. C., von Rücker A. *GSTP1* hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostate cancer: is there correlation with clinical stage // *Eur J Med Res*.— 2004.— 9 (11).— P. 523–527.
8. Dulaimi E., Ibanez de Caceres I., Uzzo R. G., Al-Saleem T., Greenberg R. E., Polascik T. J., Babb J. S., Grizzle W. E., Cairns P. Promoter Hypermethylation Profile of Kidney Cancer // *Clin Cancer Res*.— 2004.— 10.— P. 3972–3979.

9. Battagli C., Uzzo R. G., Dulaimi E. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients // *Cancer Res.*— 2003.— 63.— P. 8695–8699.
10. Cao D. L., Yao X. D. Advances in biomarkers for early diagnosis of prostate cancer // *Chin J Cancer.*— 2010.— 29 (2).— P. 220–233.
11. Gonzalgo M. L., Pavlovich C. P., Lee S. M. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens // *Clin Cancer Res.*— 2003.— 9 (7).— P. 2673–2677.
12. Clark S. J., Statham A., Stirzaker C., Molloy P. L., Frommer M. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis // *Nature Protocols.*— 2006.— 1.— P. 2353–2364.

**SHVACKO L.P., SHUMEIKO I.S., TELEGEEV G.D.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics,*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: l.shvachko@ukr.net*

**DNA-METHYLATION STATUS OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE P1 GENE (GSTP1) IN THE UROGENITAL MALIGNANCIES**

**Aims.** Epigenetic changes are observed in different types of cancers and can offer suitable markers for diagnostic uses. The changes in glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) expression may be involved in the initiation and progression of urogenital malignancies and are often caused by an aberrant DNA-methylation of its CpG-island-promoter. The purpose of current study was to analyze DNA-methylation status of *GSTP1* promoter using genomic DNAs from the cancer-associated night urea cells from the patients with kidney, bladder and prostate tumors. **Methods.** Genomic DNA was extracted from the blood and night urea samples from the urogenital malignancy patients and healthy samples (placenta, fetal blood). Bisulfite conversion of genomic DNA with following methylation-specific PCR were used to DNA methylation *GSTP1* promoter study. **Results.** We have shown that *GSTP1* CpG-island-promoter is aberrantly hypermethylated in genomic DNA, extracted from the night urea of patients with urogenital malignancies (kidney, bladder, prostate tumors). In contrast, in the peripheral blood of these cancer patients and healthy controls *GSTP1* CpG-promoter really retained physiological unmethylated state. **Conclusions.** Aberrant *GSTP1* promoter DNA-methylation may be used as an available biomarker for the development of non-invasive diagnostic of urogenital malignancies in the urea biosamples.

**Keywords:** GSTP1 gene, DNA-methylation, urogenital malignancies, DNA bisulfite-methylation-specific PCR.