

Генетические изменения в линии Pчоч1-КК светлоклеточного рака почки человека

А.А. Лушникова¹, Л.Ф. Морозова¹, И.С. Абрамов², Т.С. Дубровина¹, А.В. Балбуцкий¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Анна Александровна Лушникова LAN21@yandex.ru

Перевиваемая клеточная линия Pчоч1-КК из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина относится к подтипу светлоклеточного рака почки и может использоваться для исследования механизмов канцерогенеза, а также определения молекулярных мишеней таргетной терапии. Цель исследования — анализ генетических изменений в стабильной культуре клеток Pчоч1-КК для характеристики этой модельной линии.

Результаты. Изменения в генах VHL (экзоны 1, 2 и 3) и TP53 (экзоны 6–10) идентифицировали путем амплификации геномной ДНК с последующим фрагментным анализом продуктов полимеразной цепной реакции и прямым секвенированием по Сэнгеру. Выявлена протяженная делеция в экзоне 1 гена VHL в сочетании с мутацией в экзоне 7 и 2 полиморфизмами в экзоне 4 гена TP53. Такие сопряженные нарушения в генах-супрессорах могут быть одной из причин агрессивного роста опухоли и ее резистентности к стандартной терапии.

Ключевые слова: светлоклеточный рак почки, культура клеток Pчоч1-КК, ген-супрессор VHL, ген-супрессор TP53, мутация

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-81–85

Genetic alterations in the human kidney clear cell carcinoma line Pчоч1-КК

A.A. Lushnikova¹, L.F. Morozova¹, I.S. Abramov², T.S. Dubrovina¹, A.V. Balbutskiy¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Reseach Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; 3 Vavilova St., Moscow, 119991, Russia

Continuous cell line Pчоч1-КК from the collection of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center refers to the kidney clear cell carcinoma subtype. It is useful for study of carcinogenesis and molecular targets for targeted therapy.

Objective. Analysis of the genetic alterations in a stable cell culture Pчоч1-КК to characterize this model cell line.

Results. Alterations in VHL (exons 1, 2 and 3) and TP53 genes (exons 6–10) were identified by amplification of genomic DNA followed by fragment analysis polymerase chain reaction and direct Sanger sequencing. An extended deletion in exon 1 in combination with mutation in exon 7 of VHL gene and 2 polymorphisms in exon 4 of TP53 gene were revealed. Such simultaneous alterations in 2 suppressor genes might be one of the causes of aggressive tumor growth and its resistance to standard therapy.

Key words: human kidney clear cell carcinoma, cell culture Pчоч1-КК, tumor suppressor gene VHL, tumor suppressor gene TP53, mutation

Введение

Рак почки (РП) занимает 3-е место среди опухолей мочеполовой системы по частоте встречаемости и 1-е по смертности. Ежегодно в мире регистрируют около 250 тыс., а в России — более 9 тыс. случаев заболевания РП в год [1]. Наиболее распространенный подтип РП — светлоклеточный рак почки (СРП), составляющий 60–85 % всех случаев этого заболевания. Для СРП характерны высокая молекулярно-генетическая гетерогенность, метастатическая активность и неблагоприятный прогноз. В опухолевых клетках больных СРП обнаружен целый спектр генетических нарушений, включая мутации, потерю гетерозиготности и аберрантное метилирование промоторных областей, а также патологические полиморфные варианты генов-супрессоров [2]. Генетический анализ местно-распространенного и метастатического РП позволяет решить

вопрос о применении таргетных препаратов и улучшить прогноз заболевания. Результативность таргетной терапии РП и прогноз заболевания зависят от спектра генетических нарушений в опухолевых клетках, поэтому молекулярно-генетическая характеристика РП имеет важное значение как для выбора терапии, так и для идентификации клинически значимых опухолевых маркеров.

Использование уже имеющихся маркеров для таргетной терапии РП в клинической практике затруднено из-за высокой гетерогенности заболевания, обусловленной поликлональностью опухолей. Спектр молекулярно-генетических изменений довольно широк и может варьировать даже в пределах одного и того же новообразования. Поэтому идентификация генетических нарушений в первичной опухоли не всегда соответствует прогнозу и терапии РП на более поздних

этапах болезни, и основным методом лечения по-прежнему остается хирургическое удаление опухоли.

Клеточные модели РП представляют большой интерес как для изучения механизмов канцерогенеза в целом, так и для воздействия молекулярно направленных препаратов на рост опухоли, в частности.

Цель исследования – характеристика генетических нарушений в клетках культивируемой линии СРП Рпоч1-КК.

Материалы и методы

Перевиваемая клеточная линия Рпоч1-КК была получена из опухолевого фрагмента Рпоч1 2-го пассажа, представленного в коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина [3]. Гистологическое исследование опухолевой ткани на первых 4 пассажах при трансплантации на бестимусных мышей выявило признаки трабекулярно-папиллярного светлоклеточного рака. Клетки выращивали в питательной среде RPMI1640/DMEM в соотношении 1:1 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, пирувата натрия, комплекса витаминов и аминокислот в разведении 1:1000 стандартных концентраций этих препаратов (ПанЭко, Россия).

Мутации генов *VHL* (экзоны 1, 2 и 3) и *TP53* (экзоны 6–10) идентифицировали путем амплификации геномной ДНК с последующим фрагментным анализом продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и прямым секвенированием по Сэнгеру. Геномную ДНК из 3-суточной культуры клеток Рпоч1-КК выделяли с помощью набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ИнтерЛабСервис, Россия) по инструкции производителя. В смесь для амплификации гена *VHL* методом ПЦР входило 5 мкл (20 нг) геномной ДНК; 2,5 Ед Taq-полимеразы; буфер, содержащий 3 мМ хлорида магния ($MgCl_2$); по 200 мкл каждого из 4 нуклеотидтрифосфатов; по 0,2 пМ прямого и обратного праймеров; стерильная деионизированная вода до конечного объема 25 мкл. После активации полимеразы при температуре 94 °С в течение 5 мин выполняли 35 циклов амплификации в следующем режиме: денатурация при тем-

пературе 94 °С 30 с, отжиг праймеров при температуре 57–62 °С 30 с, элонгация при температуре 72 °С 30 с, финальная элонгация 5 мин (см. таблицу). Минисеквенирование и детекцию генетических изменений в режиме фрагментного анализа проводили с помощью оборудования ААТИ Fragment Analyzer с использованием набора реагентов DNF-910 dsDNA Reagent Kit 35-1500bp, позволяющего разделять фрагменты длиной от 35 п. н. до 1500 п. о. с допустимой погрешностью 5 п. н. Полученные данные обрабатывали с помощью программы PROSize 2.0.

Для амплификации экзонов 6–10 гена *TP53* с последующим прямым секвенированием ПЦР-продуктов использовали праймеры коммерческой NGS-панели SeqPlate *TP53* компании Tib Molbiol [4].

Результаты и обсуждение

Около 2 % больных РП страдают наследственным синдромом Хиппеля–Линдау – аутосомным заболеванием, которое обусловлено инактивацией гена-супрессора *VHL* вследствие герминальных мутаций. Инактивация этого гена и/или aberrантное метилирование промотора и потеря гетерозиготности обнаружены у 54 % российских пациентов уже на I стадии СРП. У больных СРП с метастазами на момент постановки диагноза выявлены аллельные делеции 2 или более других генов-супрессоров, локализованных на хромосоме 3p [5]. Молекулярные нарушения гена *VHL* характерны именно для СРП, но не для более редких папиллярного, хромофобного и других подтипов РП. Мутации и aberrантное метилирование гена *VHL* выявлены в 45,3 % (87 из 192) исследованных образцов спорадического СРП. При этом вероятность метастазирования опухолей, несущих делеции хромосомы 3p и/или мутации гена *VHL*, очень высока [6].

Ген *VHL* локализован на хромосоме 3p25, содержит 3 экзона и кодирует полипептид, состоящий из 213 аминокислотных остатков (рис. 1).

Белок pVHL необходим для функционирования убиквитин-лигазного комплекса и деградации фактора 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α), индуцируемого гипоксией. Указанные выше изменения в гене приводят к ингибированию его экспрессии или синтезу дефектного белка. Показано, что *VHL*-ассоциированные изменения в опухоли при СРП влияют на клеточный метаболизм, секрецию, взаимодействие опухолевых клеток со стромой и Т-клеточный иммунный ответ [7, 8].

Анализ мутаций генов-супрессоров *VHL* и *TP53*. В результате фрагментного анализа экзона 1 гена *VHL* в клетках линии Рпоч1-КК был выявлен ПЦР-продукт длиной 290 п. н., тогда как в морфологически нормальной ткани длина этого фрагмента составляет 417–420 п. н. Таким образом, в опухолевых клетках имеется протяженная делеция гена *VHL* в экзоне 1 длиной 125 ± 5 п. н. (в пределах погрешности метода). Продукты амплификации экзонов 2 и 3 не отличались от нормы. Это указывает на возможную делецию участка хромосомы

Праймеры к гену *VHL* и условия полимеразной цепной реакции

Экзон	Последовательность праймеров 5' → 3'	Температура отжига, °С	Длина продукта полимеразной цепной реакции, п. о.
1	tggtctggatcgcggaggaat	61	416
	ggcttcagaccgtctatcg		
2	accggtgtggctctttaaacc	62	227
	tcaagtgtctatctgtacttac		
3	tgccactgaggatttggttttgc	57	250
	aaagctgagatgaacagtgtaag		

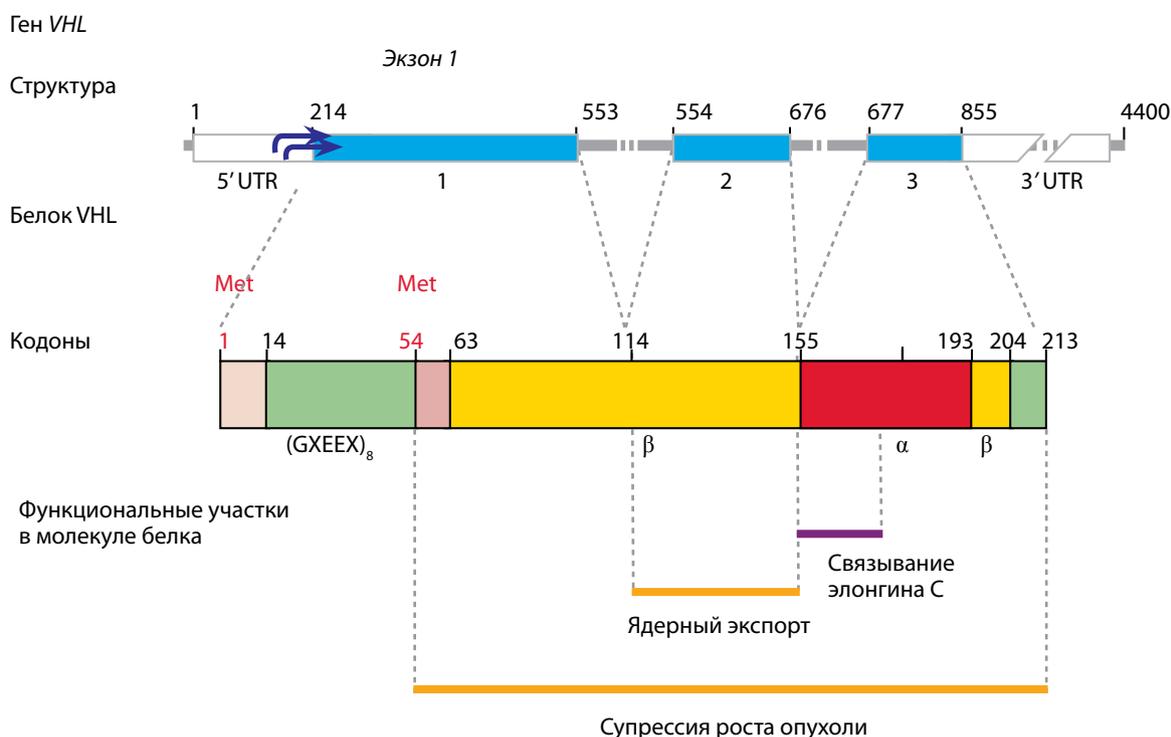


Рис. 1. Структура гена *VHL* и кодируемого им белка-супрессора *pVHL*. Цифрами обозначены нуклеотиды (ген) и кодоны (белок). Экзоны обозначены голубыми прямоугольниками. Дефектный белок *pVHL* не связывается с элонгином С, в результате чего нарушается элонгация мРНК

Зр, в котором локализован ген-супрессор роста опухоли *VHL*, играющий важную роль в неопластическом прогрессии.

Известно, что инактивация гена *VHL* играет ключевую роль в генезе как наследственных, так и спорадических форм СРП. По данным Д.С. Михайленко, соматические мутации гена *VHL* были обнаружены в 32,3 % случаев СРП и в 26,6 % образцов архивного или замороженного опухолевого материала с преобладанием изменений в экзонах 1 и 2. При этом подавляющее большинство (76,7 %) мутаций относились к делециям [5].

Утрата гена *VHL* нередко выявляется при СРП как раннее генетическое изменение, сопровождающееся последующей индукцией фактора HIF- α , поскольку продукт гена *VHL* – pVHL – ключевой компонент убиквитин-лигазного комплекса, регулирующего протеолиз этого фактора. Показано также, что в метафазе белок pVHL входит в состав centrosom и регулирует сигналинг, зависимый от рецептора эстрогена α (ER- α). Ингибирование этого сигнального пути критично для регуляции формирования микротрубочек и развития лекарственной устойчивости опухоли [9].

В результате ПЦП-анализа с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру экзонов 6–10 гена *TP53* была обнаружена однонуклеотидная замена в экзоне 7 – с.742 C>T, приводящая к замене аргинина на триптофан Arg->Trp в кодоне 248. Эта патогенетическая мутация описана как герминальная (см. ссылку в базе данных BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs121912651 и ссылку NP_001119584–86.1:

р. Arg248Trp в базе HGVS). В базе данных Cosmic эта мутация гена *TP53* описана как соматическая: ENST00000420246> p.R248W/c.742C>T (см. ссылку <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=3388183>). Клетки Рпоч1-КК гомозиготны по указанной мутации (рис. 2).

Кроме того, в клетках изучаемой культуры в гомозиготном состоянии выявлены 2 полиморфизма: R72P – замена аргинина (R) на пролин (P) в кодоне 72, соответствующая нуклеотидной замене в экзоне 4 гена *TP53*, и IVS6+62G/A – G. Таким образом, в линии Рпоч1-КК СРП обнаружены мутации одновременно в 2 генах-супрессорах роста опухоли: *VHL* и *TP53*.

Показано, что молекулярные нарушения в гене *VHL*, скорее всего, относятся к ранним событиям канцерогенеза и чаще обнаруживаются у больных с I–II стадиями заболевания, чем с III–IV стадиями. У пациентов с инактивацией гена *VHL* достоверно чаще наблюдается отдаленное метастазирование РП в лимфатические узлы и печень: у 48,0 % пациентов – метастазы в лимфатические узлы и у 17 % – в печень; при отсутствии изменений в гене *VHL* метастазы в лимфатические узлы наблюдаются у 17 % пациентов, а в печень не обнаруживаются. Однако регуляция уровня экспрессии факторов роста, вовлеченных в ангиогенез и пролиферацию опухолевых клеток, зависит не только от активности сигнального пути АКТ/mTOR/HIF/VEGF/PDGF, но и от p53-зависимого сигналинга [10].

Синдром Ли–Фраумени, обусловленный мутациями в гене *TP53*, относится к редким наследственным патологиям. Тем не менее, соматические мутации, вы-

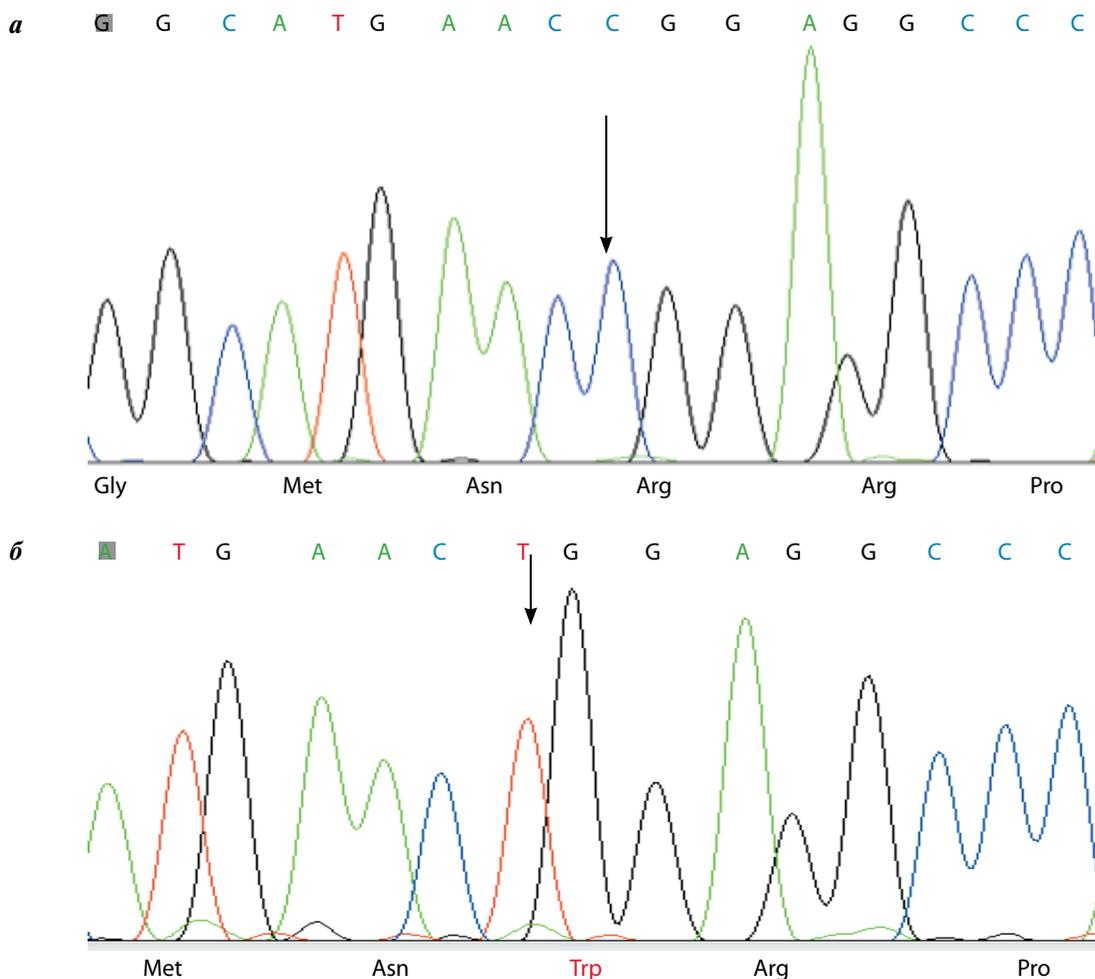


Рис. 2. Результаты прямого секвенирования экзона 7 гена *TP53*: а – фрагмент нуклеотидной последовательности экзона 7 гена *TP53* дикого типа, внизу показана кодируемая аминокислотная последовательность; б – мутация, выявленная в клетках Рпч1-КК. Стрелкой показан сайт с однонуклеотидной заменой с. 742С>Т в экзоне 7 гена *TP53*, приводящей к замене аргинина на триптофан в кодоне 248 – р. R248W

зывают утрату функции обоих аллелей гена *TP53*, – наиболее частые генетические изменения, наблюдаемые в спорадических опухолях. Мутации в гене *TP53* или делеция сегмента хромосомы 17р (участок p13.1), включающей ген *TP53*, характерны для таких онкологических заболеваний, как рак молочной железы, яичников, мочевого пузыря, шеи, пищевода, кожи, легких, глиобластома мозга, остеогенная саркома, гепатоклеточная карцинома, колоректальный рак.

Ген *TP53* дикого типа ингибирует транскрипцию генов, кодирующих белки, которые определяют множественную лекарственную устойчивость опухоли. Мутантный ген *TP53* повышает экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости и резистентность опухоли к терапии. Мутации гена *TP53* связаны с устойчивостью опухолевых клеток к препаратам на основе платины, а также с активацией онкогенов *FGFR3* и *HRAS* [11].

Помимо генетических данных, о плохом прогнозе РП могут свидетельствовать результаты иммуногистохимических исследований, которые позволяют обнаружить в клетках линии Рпч1-КК повышенную экспрессию онкогенов *sis*, *c-myc*, *myb* [3].

Заключение

Опухолевая гетерогенность РП – один из основных механизмов клональной эволюции и адаптации опухоли к меняющимся условиям микроокружения и поддержания ее злокачественного потенциала. Соотношение различных популяций опухолевых клеток в пределах одной опухоли и преобладание одного из клонов на определенном этапе канцерогенеза обуславливают уникальность биологии опухоли и ее резистентность к стандартной терапии [12]. Выявление хромосомных aberrаций в субклонах и анализ их дальнейшей эволюции в опухоли играют решающую роль в выборе адекватного лечения. Потенциальные мишени для воздействия молекулярно направленными препаратами – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), рецепторы к ростовым факторам (VGFR, PDGFR, EGFR, FGFR), сигнальный белок mTOR. Поиск новых молекулярных мишеней – актуальная проблема, которая требует дальнейших исследований на охарактеризованных клеточных моделях.

В клетках перевиваемой линии СРП мы обнаружили мутации одновременно в 2 генах-супрессорах роста

опухоли: протяженная делеция длиной 125 ± 5 п. н. в экзоне 1 гена *VHL*, нуклеотидная замена в экзоне 7 гена *TP53*, а также 2 полиморфизма в гомозиготном состоянии: R72P – замена аргинина (R) на пролин

(P) в кодоне 72 и IVS6+62G/A – G. Эти генетические изменения указывают на возможные причины агрессивного роста СРП и необходимость развития новых подходов к таргетной терапии РП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдова М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с. [Davydova M.I., Akseľ' E.M. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2012. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs, 2014. 226 p. (In Russ.)].
2. Михайленко Д.С., Попов А.М., Курьин Р.В. и др. Анализ молекулярно-генетических нарушений в генах *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* при светлоклеточном раке почки. Медицинская генетика 2008;(4):9–14. [Mikhaylenko D.S., Popov A.M., Kuryin R.V. et al. Analysis of molecular & genetic defects in *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* and *TP53* genes at the clear cell adenocarcinoma. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2008;(4):9–14. (In Russ.)].
3. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред. М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009. С. 37–38. [Collection of human tumor strains. Ed. Davydov M.I. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2009. Pp. 37–38. (In Russ.)].
4. Lyubchenko L.N., Abramov I.S., Bateneva E.I. et al. DNA-diagnostics for inherited breast and/or ovarian cancer: standard approaches and novel technologies; Eur J Hum Gen 2014;22(1):243.
5. Михайленко Д.С. Анализ молекулярно-генетических нарушений, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований почки. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008. [Mikhaylenko D.S. Analysis of molecular & genetic defects, associated with the development of malignant kidney tumors. Author's abstract of thesis ... of candidate of medical sciences. Moscow, 2008. (In Russ.)].
6. Михайленко Д.С., Григорьева М.В., Землякова В.В. и др. Молекулярно-генетические нарушения в гене *VHL* и метилирование некоторых генов-супрессоров в спорадических светлоклеточных карциномах почки. Онкоурология 2010;(2):32–6. [Mikhaylenko D.S., Grigor'eva M.V., Zemlyakova V.V. et al. Molecular & genetic defects in *VHL* gene and methylation of some suppressing genes in sporadic clear cell kidney carcinomas. Onkourologiya = Cancer Urology 2010;(2):32–6. (In Russ.)].
7. Leisz S., Schulz K., Erb S. et al. Distinct von Hippel-Lindau gene and hypoxia-regulated alterations in gene and protein expression patterns of renal cell carcinoma and their effects on metabolism. Oncotarget 2015;6(13):11395–406.
8. Stehle F., Leisz S., Schulz K. et al. VHL-dependent alterations in the secretome of renal cell carcinoma: association with immune cell response. Oncotarget 2015;6(41):43420–37. PMID: 26486078.
9. Jung Y.S., Chun H.Y., Yoon M.H., Park B.J. Elevated estrogen receptor- α in VHL-deficient condition induces microtubule organizing center amplification via disruption of BRCA1/Rad51 interaction. Neoplasia 2014;16(12):1070–81. DOI: 10.1016/j.neo.2014.09.013.
10. Носов Д.А., Яковлева Е.С., Федянин М.Ю. и др. Прогностическое значение инактивирующих нарушений в гене *VHL* у больных метастатическим почечно-клеточным раком. Онкоурология 2011;(3):47–51. [Nosov D.A., Yakovleva E.S., Fedyanin M.Yu. et al. Prognostic value of desactivating defects in *VHL* gene at patients with metastatic renal cell carcinoma. Onkourologiya = Cancer Urology 2011;(3):47–51. (In Russ.)].
11. Alexiev B.A., Drachenberg C.B. Clear cell papillary renal cell carcinoma: incidence, morphological features, immunohistochemical profile, and biologic behavior: a single institution study. Pathol Res Pract 2014;210(4):234–41.
12. Yates L.R., Campbell P.J. Evolution of cancer genome. Nat Rev Genet 2012;13(11):795–806.