

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-39-49
УДК: 616.61-006.6:575.224.2

Для цитирования: *Солодских С.А., Паневина А.В., Новикова А.Г., Дворецкая Ю.Д., Грязнова М.В., Старков А.А., Маслов А.Ю., Михайлов А.А., Хинопулос К., Попов В.Н.* Интегральный анализ геномных и транскриптомных изменений при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме в российской популяции. *Сибирский онкологический журнал.* 2019; 18(6): 39–49. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-39-49.

For citation: *Solodskikh S.A., Panevina A.V., Novikova A.G., Dvoretzkaya Yu.D., Gryaznova M.V., Starkov A.A., Maslov A.Yu., Mikhailov A.A., Khinopulos K., Popov V.N.* Integral analysis of genomic and transcriptomic changes in clear cell renal cell carcinoma in the russian population. *Siberian Journal of Oncology.* 2019; 18(6): 39–49. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-39-49.

ИНТЕГРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

**С.А. Солодских¹, А.В. Паневина¹, А.Г. Новикова¹, Ю.Д. Дворецкая¹,
М.В. Грязнова¹, А.А. Старков², А.Ю. Маслов^{1,3}, А.А. Михайлов^{1,4},
К. Хинопулос⁵, В.Н. Попов^{1,6}**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Россия¹
Россия, г. Воронеж, 394000, Университетская площадь, 1. E-mail: s.solodskikh@gmail.com¹

Колледж Уэйлл Медикал Корнеллского университета, г. Нью-Йорк, США²
США, г. Нью-Йорк, 1300, Йорк Авеню, 10065²

Медицинский колледж им. Альберта Эйнштейна, г. Бронкс, США³
США, г. Бронкс, 1300, Моррис Парк Авеню, 10461³

БУЗ ВО «Воронежский областной клинический онкологический диспансер», г. Воронеж, Россия⁴
Россия, 394000, г. Воронеж, ул. Вайцеховского, 4⁴

Университет Земмельвайса, г. Будапешт, Венгрия⁵
Венгрия, г. Будапешт, 1085, ул. Ульти, 26⁵

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
г. Воронеж, Россия⁶

Россия, г. Воронеж, 394000, просп. Революции, 19⁶

Аннотация

Почечно-клеточная карцинома (ПКК) является одной из наиболее распространенных солидных опухолей почки (90 % всех случаев рака почки), при этом светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (скПКК) – наиболее часто встречающийся тип ПКК. Данная опухоль характеризуется множеством нарушений работы генома и транскриптома в опухоли. Молекулярные механизмы развития скПКК изучались в течение длительного времени. Установлена популяционная специфичность данных нарушений как между локальными популяциями в европейской суперпопуляции, так и между различными суперпопуляциями. В настоящий момент геномные и транскриптомные нарушения, связанные с скПКК, в западноевропейских популяциях России изучены плохо. В Центрально-Черноземном регионе России (включая Воронежскую область), охватывающем значительную часть европейской части России, таких исследований не проводилось. Также не проводилось каких-либо интегральных исследований геномных и транскриптомных данных. Мы провели целевое секвенирование ключевых онкогенов, входящих в состав панели AmpliSeq Cancer HotSpot Panel v2, и полногеномное исследование экспрессии с использованием ДНК-микроматриц Affymetrix у 58 пациентов с ПКК, относящихся к популяции западной части Российской Федерации. С применением разработанного нами интегрального анализа геномных и транскриптомных данных нами впервые было установлено, что ядерный комплекс NFκB, рецептор ERBB2 и фактор транскрипции TP53 ассоциированы с наблюдаемыми изменениями экспрессии и являются ключевыми регуляторами в работе функциональных и сигнальных генных сетей. Также был проведен анализ мутационного ландшафта в ключевых генах, ассоциированных с

раком. Наши наблюдения говорят о том, что молекулярные механизмы ПКК отличаются в различных популяциях, поскольку обнаруженные регуляторы экспрессии ранее не были описаны как медиаторы экспрессии при ПКК. Рецептор ERBB2 является целью большого числа различных видов таргетной терапии рака молочной железы. Помимо этого, в настоящий момент имеется несколько клинических случаев успешной терапии тубулярного рака почки, колоректального рака и рака желудка. На основе полученных нами данных возможна разработка новых способов терапии ПКК с использованием уже установленных и апробированных линий терапии, применяемых при других видах рака.

Ключевые слова: рак, микроматрицы, мутации, геном, транскриптом, почечно-клеточная карцинома, рак почки.

INTEGRAL ANALYSIS OF GENOMIC AND TRANSCRIPTOMIC CHANGES IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA IN THE RUSSIAN POPULATION

S.A. Solodskikh¹, A.V. Panevina¹, A.G. Novikova¹, Yu.D. Dvoretzkaya¹,
M.V. Gryaznova¹, A.A. Starkov², A.Yu. Maslov^{1,3}, A.A. Mikhailov^{1,4},
K. Khinopoulos⁵, V.N. Popov^{1,6}

Voronezh State University, Voronezh, Russia¹

1, Universitetskaya Square, 394000, Voronezh, Russia. E-mail s.solodskikh@gmail.com¹

Cornell University Weill Medical College, New York, USA²

1300, York Avenue, 10065, New York, USA²

College of Medicine Albert Einstein, Bronx, USA³

1300, Morris Park Avenue, 10461, Bronx, USA³

Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh, Russia⁴

4, Vaitsekhovskogo Street, 394000, Voronezh, Russia⁴

Semmelweis University, Budapest, Hungary⁵

26, Ulti Street, 1085, Budapest, Hungary⁵

Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia⁶

19, Prospect Revolution, 394000, Voronezh, Russia⁶

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common form of kidney cancer, accounting for about 90 % of cancers in the kidney. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common histological type of RCC. Clear cell renal cell carcinoma is characterized by specific genomic and transcriptomic aberrations in the tumor. We performed a targeted sequencing of key oncogenes and a genome-wide expression study in 58 patients with RCC belonging to a population of the western part of the Russian Federation. The integrative analysis of genomics and transcriptome data revealed that the NFκB nuclear complex, ERBB2 receptor, and TP53 transcription factor were the key regulators of observed changes in the expression. We also carried out the analysis of the mutational landscape in key genes associated with cancer. We found the difference in the molecular mechanisms of RCC between different populations, since the detected expression regulators were not previously described as expression mediators in RCC. Since the ERBB2 receptor is a highly attractive target for therapeutic interventions of breast cancer, we will eventually be able to develop new treatment modalities for RCC.

Key words: cancer, microarrays, mutations, genome, transcript, renal cell carcinoma, kidney cancer.

Введение

Рак почки находится на 12-м месте по частоте встречаемости в мире среди злокачественных новообразований (ЗНО), составляя от 2 до 3 % всех видов ЗНО, число вновь диагностированных случаев рака почки увеличивается на 1,5–5,9 % ежегодно [1, 2]. Почечно-клеточная карцинома (ПКК) является самой распространённой солидной опухолью почки, на нее приходится 90 % всех ЗНО почки [3]. Данная опухоль встречается в 1,5 раза

чаще у мужчин, чем у женщин. Однако женщины, перенесшие гистерэктомию, подвержены ПКК почти в 2 раза чаще по сравнению с неоперированными женщинами [4]. Наиболее часто ПКК встречается в возрасте 60–70 лет [2]. Курение, избыточный вес, повышенное кровяное давление и хроническое воздействие мутагенных агентов (асбеста, кадмия, свинца, соединений хлора), а также полициклических ароматических соединений [5] и нестероидных противовоспалительных препара-

ратов [6] являются описанными этиологическими факторами ПМК.

Почечно-клеточная карцинома является одной из основных причин смертности среди всех видов ЗНО выделительной системы. Показатели 5-летней выживаемости варьируют от 60 до 70 %, значительно снижаясь при метастатическом ПМК. В большинстве случаев ПМК демонстрирует относительную резистентность к химио- и радиотерапии, но хорошо отвечает на таргетную и иммунотерапию.

Несмотря на то, что наследственные факторы оказывают гораздо меньшее влияние на предрасположенность к ПМК по сравнению с факторами среды, у родственников пациентов риск развития данной опухоли в 2–4 раза выше, чем в общей популяции [7]. Повышенный риск возникновения ПМК также ассоциирован с наследственной папиллярной почечной карциномой, наследственным лейомиоматозом, синдромом Бёрта–Хога–Дьюба, гиперпаратиреозом, наследственным папиллярным раком щитовидной железы, синдромом фон Хиппеля–Линдау и серповидноклеточной анемией. У пациентов с приобретенной поликистозной болезнью почек ПМК развивается в 30 раз чаще, чем у здоровых людей [8].

Почечно-клеточная карцинома имеет несколько подтипов. Светлоклеточный ПМК (скПМК) составляет 60–70 % всех случаев ПМК и характеризуется клетками с прозрачной цитоплазмой, окруженной толстой цитоплазматической мембраной с округлым гладким ядром. В большинстве случаев скПМК характеризуется односторонним поражением и встречается одинаково часто как в левой, так и в правой почке. Тем не менее скПМК может иметь несколько источников. В этих случаях скПМК может поражать обе почки одновременно и может сочетаться с аденомой. Этот вариант ПМК распространен среди пациентов с наследственными формами рака и сопутствующими нарушениями: кистами почек, синдромом фон Хиппеля–Линдау и первичными множественными опухолями. скПМК характеризуется перестройками 3-й хромосомы, инактивацией гена VHL вследствие мутаций или гиперметилирования промотора, амплификацией 5p и мутациями в генах KDM6A/UTX, SETD2, KDM5C/JARID1C и MLL2. В настоящее время около 25–40 % случаев скПМК диагностируются случайным образом в ходе профилактической диагностики [9].

Папиллярная (хромофильная) ПМК встречается в 10–15 % случаев ЗНО почек. Она состоит из почечных сосочков, покрытых одинарным или двойным слоем кубических или крупных эозинофильных клеток. Этот подтип ПМК в основном связан с трисомией или тетраомией хромосом 7 и 17, потерей Y-хромосомы, амплификациями хромосом 12, 16 и 20 и мутациями в протоонкогене 4 MET.

Хромофобная ПМК составляет 3–5 % всех случаев рака почек. Она состоит из опухолевых клеток с массивной эозинофильной цитоплазмой, в основном как часть солидной опухоли. Этот подтип рака обусловлен потерей хромосом Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 и 21 [10].

Молекулярные механизмы развития скПМК изучались в течение длительного времени. Наиболее полное интегральное исследование проведено исследовательской группой Атласа ракового генома [11]. Используя несколько высокопроизводительных методов (экзомное и полногеномное секвенирование, микроматричное исследование экспрессии, исследование метилирования), группа проанализировала более 400 опухолевых образцов и выделила 19 наиболее часто мутирующих генов. Было показано, что, помимо дисфункции VHL, наиболее важные драйверные мутации локализованы в генах SETD2, PBRM1, ARID1A и SMARCA4.

Другое крупное исследование, проведенное в японской популяции, подтвердило представленные выше данные о роли генов в развитии скПМК, однако были обнаружены существенные отличия паттерна генной экспрессии от исследования Атласа ракового генома. В частности, были показаны нарушения работы сигналинга PI3K-AKT-mTOR и KEAP1-NRF2-CUL3, метилирования ДНК, путей, связанных с p53, и процессинга мРНК [12].

В совокупности результаты этих исследований свидетельствуют о том, что причины и механизмы развития скПМК существенно отличаются в различных популяциях. Это означает, что должны отличаться стратегии и результаты лечения.

В западноевропейских популяциях России геномные и транскриптомные нарушения, связанные с скПМК, изучены плохо. В Центрально-Черноземном регионе России (включая Воронежскую область), охватывающем значительную часть европейской части России, таких исследований не проводилось. Также не проводилось каких-либо интегральных исследований геномных и транскриптомных данных.

Известно, что одной из главных причин транскриптомных нарушений в клетке являются полиморфизмы в кодирующих последовательностях геномной ДНК [13]. Тем не менее автоматизированные алгоритмы для исследования геномных и транскриптомных взаимодействий еще не созданы, в связи с чем исследователи вынуждены делать выводы о данных взаимодействиях, основываясь на собственных знаниях регуляторных механизмов клетки. Основным преимуществом автоматизированных систем анализа генных сетей, таких как QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA), является возможность обнаружения скрытых регуляторных механизмов через несколько промежуточных звеньев. Данный метод позволяет выявлять генные взаимодействия, описанные ранее.

Материал и методы

Участники настоящего исследования были отобраны среди пациентов Воронежского областного клинического онкологического диспансера, проходящих лечение по поводу рака почки. Все пациенты имели диагноз: Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, подтвержденный иммуногистохимически. Исследование было утверждено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ВГУ». Во всех случаях было получено информированное согласие, пациенты были проинформированы о том, что с их биологическими материалами будут проводиться генетические исследования. Всего с использованием панели AmpliSeq HotSpot Cancer Panel v2 было проведено полногеномное секвенирование у 58 пациентов в возрасте от 33 до 80 лет (средний возраст – $60 \pm 9,91$ года).

Образцы ткани опухоли и окружающей нормальной ткани были получены в БУЗ ВО «ВОКОД» в период с 2018 по 2019 г. после выполнения нефрэктомии по поводу ПЧК. После забора образцы немедленно погружались в раствор RNAlater™ (Sigma-Aldrich, США). Образцы хранились при температуре -86°C вплоть до выделения нуклеиновых кислот. Общая РНК выделялась и очищалась с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США) в соответствии с инструкцией производителя. Геномная ДНК выделялась и очищалась с использованием набора Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, США) в соответствии с инструкцией производителя. Качество полученных нуклеиновых кислот подтверждалось горизонтальным электрофорезом в 2 % агарозном геле с окрашиванием бромидом этидия. Измерение концентрации ДНК и РНК проводилось при помощи флуориметрической системы Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Библиотеки для секвенирования с уникальными баркодами синтезировались с использованием набора Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) после целевой амплификации кодирующих частей генов, входящих в панель Ion AmpliSeq HotSpot Cancer Panel v2 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для идентификации полиморфизмов ДЕК использовалось ПО Ion Torrent Suite версии 5.10 и Torrent Variant Caller plugin версии 5.10.0.16. Все полиморфизмы с низким качеством прочтения и/или недостаточным покрытием были отфильтрованы. Аннотация полиморфизмов проводилась с использованием ПО ENSEMBL Variant Effect Predictor версии 97 [14]. Для последующей обработки использовалось ПО VCFtools версии 0.1.13 [15].

кДНК для последующей гибридизации была получена из РНК, выделенной из биологических материалов, с применением набора Ambion® WT Expression Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Измерение транскриптомных уровней мРНК про-

водилось с использованием ДНК-микроматриц GeneChip® Human Gene 2.1 ST на платформе Affymetrix® GeneAtlas™ system (Affymetrix Inc, США). Микроматрицы сканировались, после чего изображения конвертировались в цифровой формат с использованием ПО Affymetrix® GeneAtlas™ Instrument Control Software.

Обработка сигналов, нормализация, фильтрация шумов и вычитание фоновой светимости проводились в ПО Partek Genomics Suite версии 6.6 с использованием алгоритма RMA и поправкой на содержание GC-нуклеотидов в пробе. Для всех статистических тестов значимым считалось р-значение менее 0,05.

Количественная ПЦР «в реальном времени» была проведена с использованием амплификатора using CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) и полимеразы qPCRmix-HS (ООО «Евроген», Россия).

Оценка изменения экспрессии генов проводилась по методу $\Delta\Delta C_t$ с применением генов GAPDH и 18s для нормализации. Все ПЦР-эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями о минимальной информации для публикации результатов количественной ПЦР «в реальном времени» (MIQE) [16].

Анализ насыщения терминами Gene Ontology проводился с использованием Partek Genomics Suite версии 6.6. Канонические сигнальные и метаболические пути, регуляторы транскрипции, биологические эффекты и связанные заболевания, создание генных сетей и визуализация данных проводились с использованием ПО Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN, США).

Гены, несущие полиморфизмы ДНК, и гены с измененной экспрессией объединялись в один список для создания генных сетей, в которых вышестоящими регуляторами наблюдаемых изменений экспрессии могут выступать гены, имеющие мутации ДНК. Наборы данных геномных и транскриптомных исследований объединялись для создания общего списка генов. Для этой цели удалялась аннотационная информация у полиморфизмов ДНК, а генам, имеющим мутации, присваивались высокие значения изменения экспрессии (равные максимальному наблюдаемому изменению экспрессии в результатах транскриптомных опытов) и низкие р-значения. Целью этой операции была унификация двух разнородных наборов данных для последующего автоматизированного анализа взаимодействий генома и транскриптома.

Результаты

Анализ транскриптомных данных методом главных компонент показал, что все образцы делятся на 2 четких кластера, состоящих из опухолевых и нормальных тканей соответственно (рис. 1). В 3528 генах в опухолевых образцах выявлены изменения экспрессии более чем в 2 раза чаще по

Таблица 1

Соматические мутации в ДНК

Название гена	Количество носителей мутации в гене	Частота встречаемости мутации	Gene name
VHL	53	0,92	Von hippel-lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
ROS1	51	0,88	ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase
TP53	46	0,80	Tumor protein p53
SMARCA4	44	0,76	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
PDE4DIP	42	0,72	Phosphodiesterase 4D interacting protein
BCL2	42	0,72	B-cell CLL/lymphoma 2
SDHB	37	0,64	Succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (ip)
MTR	35	0,60	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
PRKDC	35	0,60	Protein kinase, dna-activated, catalytic polypeptide
MLLT10	32	0,56	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
DST	30	0,52	Dystonin
GNA11	30	0,52	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (gq class)
TFE3	28	0,48	Transcription factor binding to IGHM enhancer 3
AMER1	28	0,48	APC membrane recruitment protein 1
NBPF9	21	0,36	Neuroblastoma breakpoint family, member 15
ABL2	21	0,36	ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase
ERBB2	16	0,28	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
PER1	12	0,20	Period circadian clock 1
NUP98	12	0,20	Nucleoporin 98kda
TRIM33	9	0,16	Tripartite motif containing 33
PBX1	5	0,8	Pre-b-cell leukemia homeobox 1
ERBB3	5	0,8	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
TRIP11	2	0,4	Thyroid hormone receptor interactor 11
MN1	2	0,4	Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
GPR124	2	0,4	G protein-coupled receptor 124

сравнению с контрольными образцами, и 351 ген изменил экспрессию более чем в 5 раз.

Секвенирование ДНК выделило 98 общих мутаций в опухолевых тканях у всех пациентов (табл. 1). 14 мутаций были локализованы в генах SDHB, TRIM33, PDE4DIP, PBX1, ABL2, MTR, VHL, ROS1, PRKDC, CSMD3, MLLT10, TRIP11, PER1, BCL2, и были опухоль-специфическими. 33 были локализованы в промоторных областях генов EGFR, PDGFRA и HNF1A.

Наиболее репрезентативными для данной выборки метаболическими и сигнальными путями в соответствии с номенклатурой базы данных Ingenuity были «FXR/RXR Activation», «Intrinsic Prothrombin Activation Pathway», «Atherosclerosis Signaling», «Coagulation System», «LXR/RXR Activation», «Production of NO and ROS in Macrophages», «Cell migration and adhesion».

Наиболее сильное снижение экспрессии было зафиксировано для генов CALB1 (-190.12), HPD (-134.99), SLC36A2 (-125.85), KNG1 (-124.51) и SLC22A8 (-119.61). Наиболее сильное повышение экспрессии было зафиксировано для генов TNFAIP6 (+34.09), ANGPTL4 (+24.23), ANGPT2 (+23.69), SERPINE1 (+22.12) и CP (+20.98). Изме-

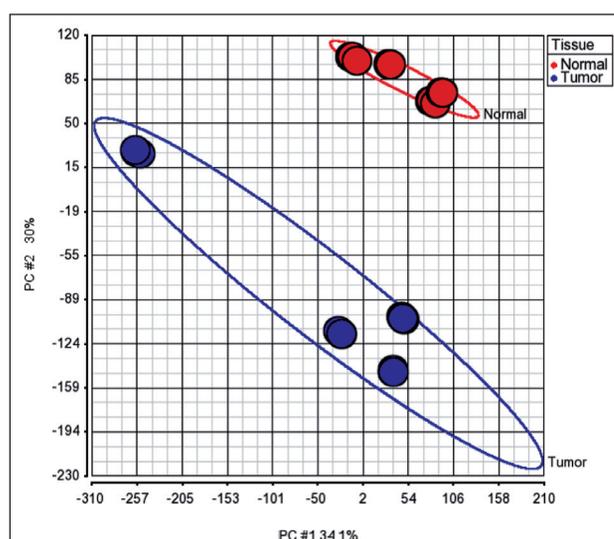


Рис. 1. Результаты анализа транскриптомных данных методом главных компонент

Гены с измененной экспрессией

р-значение	Изменение экспрессии	Название гена	Полное название гена по БД Entrez	Локализация	Тип
4,18E-05	34,097	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Внеклеточное пространство	Другое
1,06E-04	24,235	ANGPTL4	angiopoietin-like 4	Внеклеточное пространство	Другое
1,49E-03	23,692	ANGPT2	angiopoietin 2	Внеклеточное пространство	Фактор роста
6,59E-04	22,115	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Внеклеточное пространство	Другое
5,25E-05	20,981	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	Внеклеточное пространство	Фермент
2,99E-05	20,278	VCAN	versican	Внеклеточное пространство	Другое
4,96E-03	19,961	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet-associated	Цитоплазма	Другое
5,51E-06	17,585	IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	Цитоплазма	Фермент
1,01E-03	16,765	VWF	von Willebrand factor	Внеклеточное пространство	Другое
3,56E-07	15,503	C3	complement component 3	Внеклеточное пространство	Пептидаза
2,45E-06	14,204	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	Внеклеточное пространство	Другое
1,01E-04	13,702	LOXL2	lysyl oxidase-like 2	Внеклеточное пространство	Фермент
8,41E-08	-190,118	CALB1	calbindin 1, 28kDa	Цитоплазма	Другое
1,16E-07	-134,992	HPD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Цитоплазма	Фермент
5,86E-08	-125,846	SLC36A2	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2	Цитоплазматическая мембрана	Транспортный белок
1,10E-08	-124,505	KNG1	kininogen 1	Внеклеточное пространство	Другое
4,60E-08	-119,606	SLC22A8	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	Цитоплазматическая мембрана	Транспортный белок
5,83E-07	-117,063	PAH	phenylalanine hydroxylase	Цитоплазма	Фермент
8,15E-06	-93,706	UMOD	uromodulin	Внеклеточное пространство	Другое
1,41E-10	-90,867	SLC12A3	solute carrier family 12 (sodium/chloride transporter), member 3	Цитоплазматическая мембрана	Транспортный белок
1,48E-07	-79,441	SLC34A1	solute carrier family 34 (type II sodium/phosphate cotransporter), member 1	Цитоплазматическая мембрана	Транспортный белок
4,74E-08	-78,086	XPNPEP2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	Цитоплазматическая мембрана	Пептидаза
3,12E-07	-76,950	TMEM52B	transmembrane protein 52B	Цитоплазма	Другое
1,44E-08	-75,284	CLDN8	claudin 8	Цитоплазматическая мембрана	Другое
1,13E-06	-73,014	PLG	plasminogen	Внеклеточное пространство	Пептидаза
6,80E-09	-71,555	DIO1	deiodinase, iodothyronine, type I	Цитоплазма	Фермент
5,18E-07	-69,702	SLC22A6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	Цитоплазматическая мембрана	Транспортный белок

нения экспрессии для этих генов были подтверждены методом количественной ПЦР (табл. 2).

В базе данных IPA были найдены 350 из 351 гена с изменением экспрессии более чем в 5 раз. Анализ включал в себя прямые и непрямые взаимодействия между идентифицированными генами. Мы произвели анализ прямых и непрямых взаимодействий между генами с измененной экспрессией. Для этого был проведен основной анализ IPA, позволяющий идентифицировать сигнальные пути, генные сети, заболевания и биологические функции, представленные в списке генов для анализа. Также были сгенерированы генные сети с использованием низкомолекулярных соединений в качестве посредников передачи сигналов, что позволило описать сеть непрямых взаимодействий генов.

В результате анализа были сформированы 23 генные сети с z-оценками от 2 до 41. 4 сети с наибольшими z-оценками были ассоциированы со следующими заболеваниями и биологическими функциями:

1) метаболизм витаминов и минералов, молекулярный транспорт, метаболизм липидов (z-оценка=41, 25 транскриптов);

2) рак, морфология опухоли, заболевания скелета и мускулатуры (z-оценка=36, 23 транскрипта);

3) репликация, рекомбинация и репарация ДНК, метаболизм нуклеиновых кислот, биохимия низкомолекулярных соединений (z-оценка=34, 22 транскрипта);

4) нарушения развития, наследственные заболевания, метаболические расстройства (z-оценка=34, 23 транскрипта).

Обсуждение

Генетические причины, обуславливающие определенный фенотип заболевания, могут отличаться у различных индивидуумов, при этом наиболее существенные отличия наблюдаются при сравнении различных популяций [17]. Ранее мы показали, что степень злокачественности полиморфизмов ДНК в наследственном раке молочной железы, ассоциированном с генами BRCA, отличается в различных популяциях [18]. Имеющиеся результаты высокопроизводительного секвенирования и исследования экспрессии мРНК позволяют сделать вывод о том, что светлоклеточная почечно-клеточная карцинома относится к таким заболеваниям [19]. Показано, что фактор транскрипции VHL играет существенную роль в возникновении и развитии почечно-клеточной карциномы [9]. О его отсутствии либо инактивации говорит ряд работ, посвященных исследованию

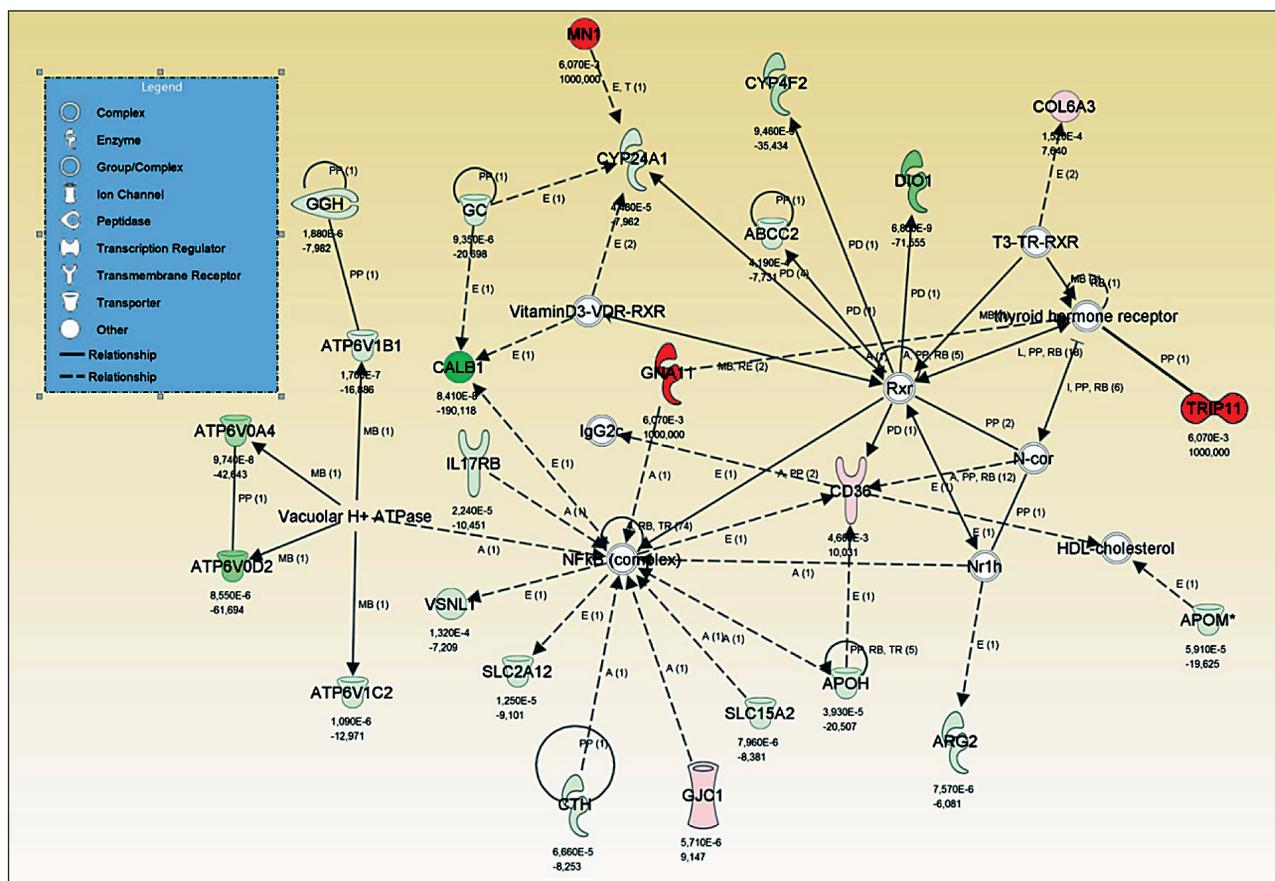


Рис. 2. Регуляция изменения экспрессии при ПКК комплексом NFκB

ПКК, что также подтверждается наблюдениями настоящего исследования. Тем не менее прочие полиморфизмы ДНК, составляющие уникальный мутационный ландшафт ПКК, существенно отличаются в европейских, американских и японских популяциях [7, 19]. Результаты настоящего исследования говорят о том, что мутационный ландшафт при ПКК у вышеупомянутых популяций также отличается от мутационного ландшафта в российских популяциях.

Комплекс NFκβ регулирует изменения экспрессии при ПКК

NFκβ является комплексным ядерным фактором транскрипции, играющим ключевую роль в регуляции индукции апоптоза, пролиферации, клеточной смерти, транскрипции, дифференциации клеток и активации клеточного роста [20]. Ранее было постулировано, что NFκβ может быть терапевтической мишенью при ПКК, однако экспериментально это не было подтверждено [13]. В соответствии с нашими данными, члены комплекса NFκβ не несут каких-либо мутаций и не меняют уровни экспрессии. Тем не менее генная сеть (рис. 2) показывает, что данный комплекс является одним из основных

регуляторов наблюдаемых изменений генной экспрессии. Также у комплекса имеются сигнальные взаимодействия с тремя генами, несущими мутации у пациентов с ПКК. Таким образом, эти наблюдения позволяют сделать вывод о том, что комплекс NFκβ выступает фактором транскрипции, регулирующим наблюдаемые изменения генной экспрессии. Регуляторная активность комплекса может быть обусловлена белок-белковыми взаимодействиями с мутантными генами.

Ген HER2 (ERBB2) несет большое количество мутаций и ассоциирован со значительными изменениями экспрессии

Наши результаты позволяют сделать вывод, что одним из основных регуляторов наблюдаемых изменений экспрессии (рис. 3) является мутантный рецептор HER2 (ERBB2). Белковый продукт этого гена представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая участвует в процессах клеточной пролиферации, роста, апоптоза, трансформации клеток, фосфорилирования белка, инвазии и миграции злокачественных клеток [21]. Он также ассоциирован с раком молочной железы и используется для скрининга и выбора терапии [22].

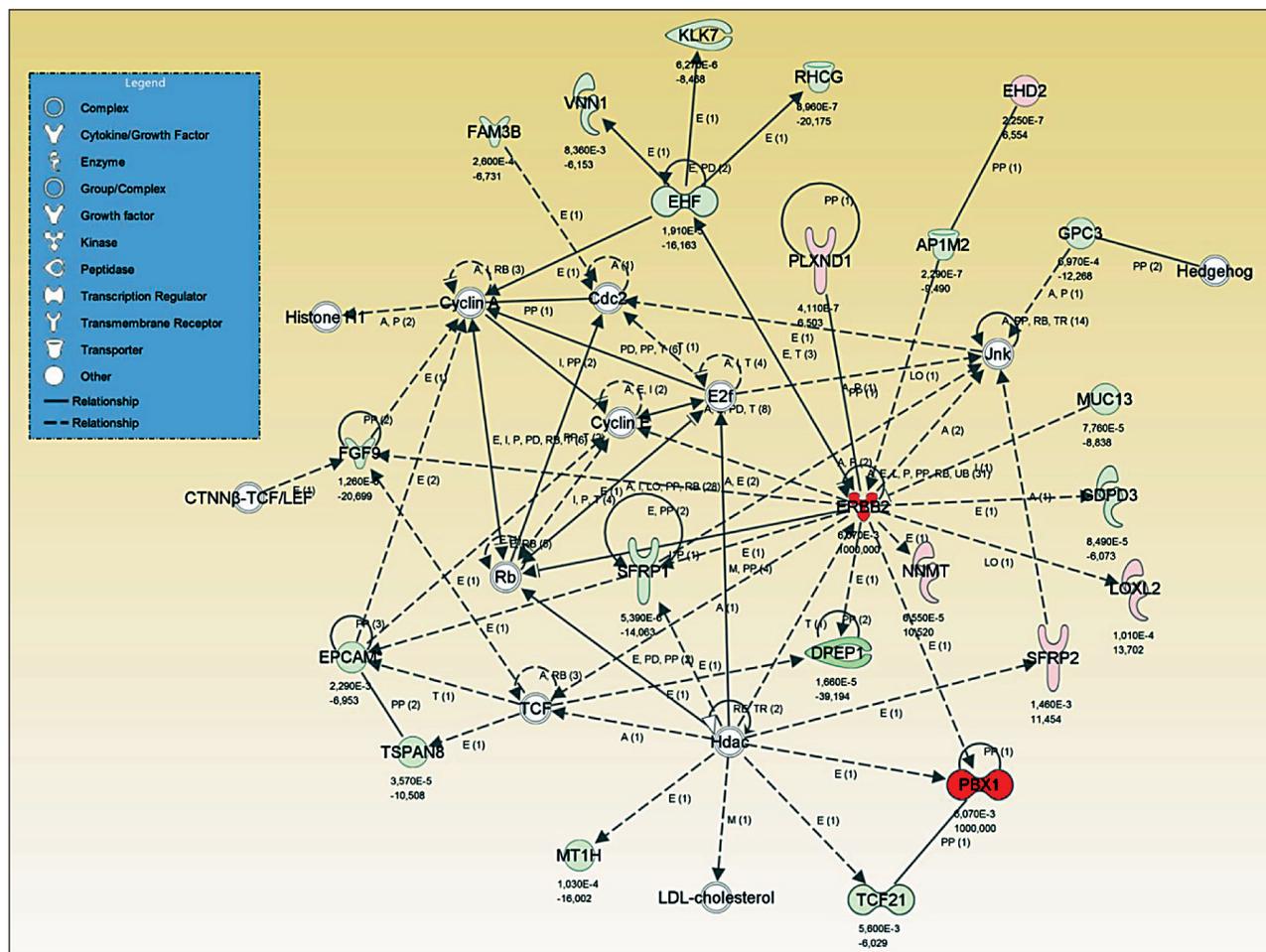


Рис. 3. Мутационный статус гена HER2 (ERBB2) и его взаимосвязь с изменениями экспрессии генов

Мутационный статус этого гена коррелирует с потенциальным прогнозом и влияет на результат лечения [23]. Ранее не было показано, что HER2 играет какую-либо значительную роль в развитии или прогрессировании ПКР.

Высокая частота встречаемости несинонимичных мутаций в гене HER2 среди исследованных нами пациентов (28 % всех пациентов имеют мутации в HER2) позволяет предположить, что его можно рассматривать как потенциальную терапевтическую мишень у пациентов с ПКР.

Насколько нам известно, есть только один зарегистрированный случай успешного лечения рака выделительной системы с помощью анти-HER2 препаратов. У пациента мужского пола с метастатической карциномой собирательного протока с большим количеством отдаленных метастазов была обнаружена мутация HER2, подходящая для терапии трастузумабом и лапатинибом. Через две недели лечения наблюдалось значительное уменьшение метастазов и уменьшение размеров основной опухоли [24]. Это позволяет сделать вывод о том, что успешное лечение ПКК может быть проведено с использованием анти-HER2-таргетной терапии.

TP53 является одним из главных факторов транскрипции, регулирующих наблюдаемые изменения экспрессии

Для того чтобы установить факторы транскрипции, обуславливающие наблюдаемые изменения экспрессии, мы произвели анализ факторов транскрипции с использованием системы IPA. Наиболее частой причиной развития ПКК является повышение концентрации факторов, индуцированных гипоксией, происходящее ввиду инактивации гена VHL [25]. Следовательно, VHL должен играть одну из наиболее важных ролей в изменениях транскрипции, происходящих в клетке, выступая в качестве фактора транскрипции.

Однако анализ геномных и транскриптомных данных, проведенный нами, показал, что ген VHL связан с 138 генами с измененной экспрессией из нашего набора данных, в то время как фактор транскрипции TP53 связан с 564 генами (рис. 4). Это наблюдение позволяет сделать вывод, что роль этих двух регуляторов в развитии ПКК в различных популяциях должна быть более тщательно исследована.

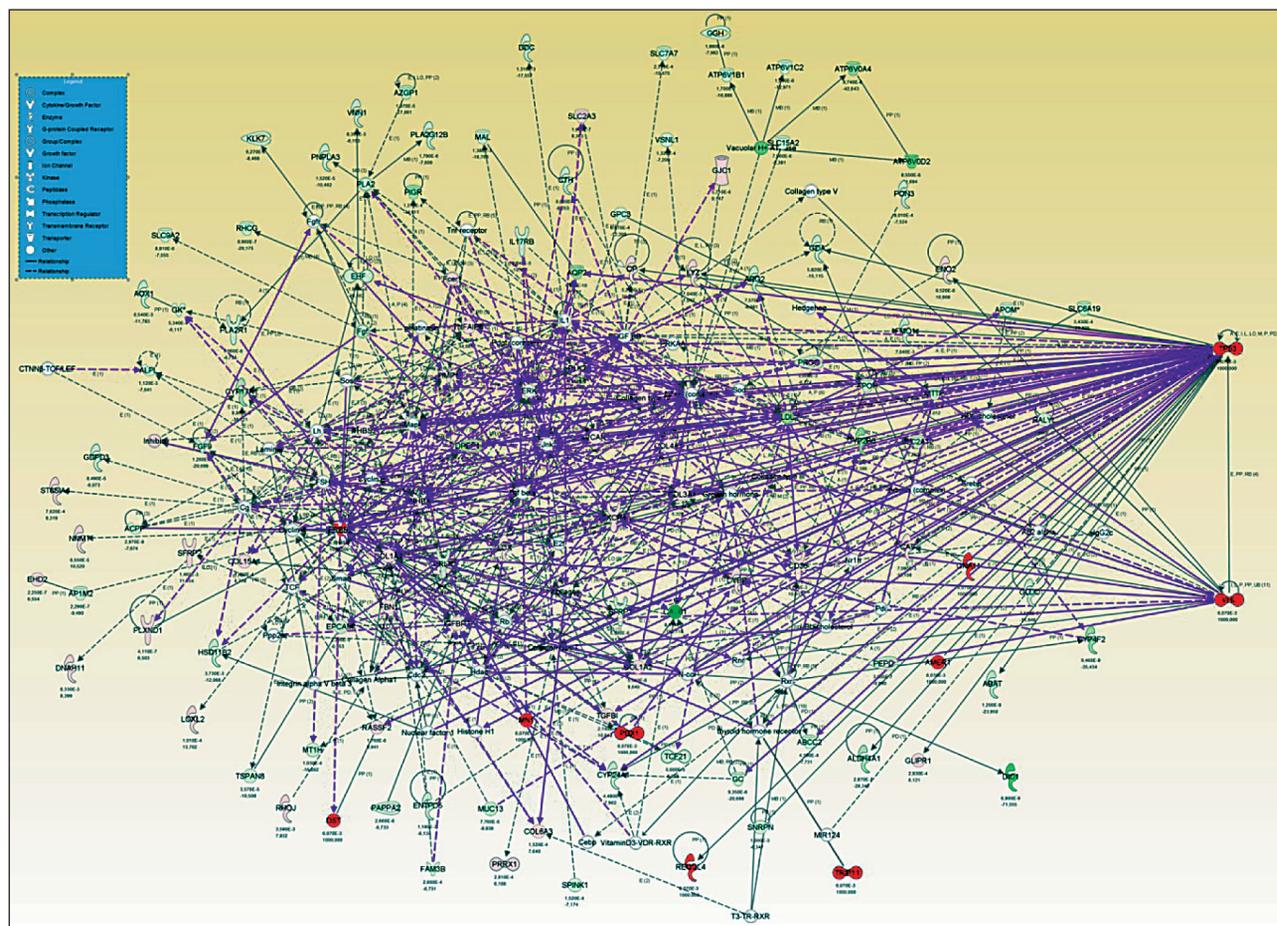


Рис. 4. Регуляция наблюдаемых изменения экспрессии фактором транскрипции TP53

Заключение

Имеющиеся методы анализа изменений профиля экспрессии и их связи с мутациям ДНК не автоматизированы и не подходят для практического клинического применения. Метод интеграции геномных и транскриптомных данных, использованный в этом исследовании, позволил нам определить возможные источники изменений экспрессии мРНК на уровне мутаций ДНК. Ряд полиморфных вариантов ДНК и генов с измененной экспрессией, обнаруженных в этом исследовании, не зарегистрированы в существующих базах данных анно-

тированных мутаций, что позволяет предположить популяционную гетерогенность причин ПКК. Эти варианты ДНК и изменения уровней мРНК могут быть использованы в качестве прогностических биомаркеров почечно-клеточного рака.

Мы предполагаем, что комплексный анализ молекулярных механизмов развития и прогрессирования опухолей с использованием автоматизированных систем анализа может позволить получать важную информацию о взаимосвязях генома и транскриптома и находить новые потенциальные методы лечения опухолей.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
2. Bazzi W.M., Sjoberg D.D., Feuerstein M.A., Maschino A., Verma S., Bernstein M., O'Brien M.F., Jang T., Lowrance W., Motzer R.J., Russo P. Long-Term Survival Rates after Resection for Locally Advanced Kidney Cancer: Memorial Sloan Kettering Cancer Center 1989 to 2012 Experience. *J Urol.* 2015 Jun; 193(6): 1911–6. doi: 10.1016/j.juro.2014.12.022.
3. Wu X., Shu X. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Renal Cell Carcinoma.* Tokyo: Springer Japan; 2017: 1–18. doi: 10.1007/978-4-431-55531-5_1.
4. Cheville J.C., Lohse C.M., Zinke H., Weaver A.L., Blute M.L. Comparisons of Outcome and Prognostic Features Among Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27(5): 612–624. doi: 10.1097/0000478-200305000-00005.
5. Kume H., Takahashi S., Teramoto S., Isurugi K. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU Int.* 2001; 88(7): 804–804. doi: 10.1046/j.1464-410-X.2001.2505b.x.
6. Choueiri T.K., Je Y., Cho E. Analgesic use and the risk of kidney cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Cancer.* 2014 Jan 15; 134(2): 384–96. doi: 10.1002/ijc.28093.
7. Ridge C., Pua B., Madoff D. Epidemiology and Staging of Renal Cell Carcinoma. *Semin Intervent Radiol.* 2014; 31(01): 003–008. doi:10.1055/s-0033-1363837.
8. Moch H., Cubilla A.L., Humphrey P.A., Reuter V.E., Ulbright T.M. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. *Eur Urol.* 2016 Jul; 70(1): 93–105. doi: 10.1016/j.euro.2016.02.029.
9. Gossage L., Eisen T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 May; 7(5): 277–88. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.42.
10. Cheng L., Zhang S., MacLennan G.T., Lopez-Beltran A., Montironi R. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum Pathol.* 2009; 40(1): 10–29. doi: 10.1016/j.humpath.2008.09.009.
11. Ricketts C.J., De Cubas A.A., Fan H., Smith C.C., Lang M., Reznik E., Bowlby R., Gibb E.A., Akbani R., Beroukhi R., Bottaro D.P., Choueiri T.K., Gibbs R.A., Godwin A.K., Haake S., Hakimi A.A., Henske E.P., Hsieh J.J., Ho T.H., Kanchi R.S., Krishnan B., Kwiatkowski D.J., Lui W., Merino M.J., Mills G.B., Myers J., Nickerson M.L., Reuter V.E., Schmidt L.S., Shelley C.S., Shen H., Shuch B., Signoretti S., Srinivasan R., Tamboli P., Thomas G., Vincent B.G., Vocke C.D., Wheeler D.A., Yang L., Kim W.Y., Robertson A.G.; Cancer Genome Atlas Research Network, Spellman P.T., Rathmell W.K., Linehan W.M. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.* 2018 Jun 19; 23(12): 3698. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.032.
12. Sato Y., Yoshizato T., Shiraishi Y., Maekawa S., Okuno Y., Kamura T., Shimamura T., Sato-Otsubo A., Nagae G., Suzuki H., Nagata Y., Yoshida K., Kon A., Suzuki Y., Chiba K., Tanaka H., Niida A., Fujimoto A., Tsunoda T., Morikawa T., Maeda D., Kume H., Sugano S., Fukayama M., Aburatani H., Sanada M., Miyano S., Homma Y., Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2013 Aug; 45(8): 860–7. doi: 10.1038/ng.2699.
13. Lek M., Karczewski K.J., Minikel E.V., Samocha K.E., Banks E., Fennell T., O'Donnell-Luria A.H., Ware J.S., Hill A.J., Cummings B.B., Tukiainen T., Birnbaum D.P., Kosmicki J.A., Duncan L.E., Estrada K. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016 Aug 18; 536(7616): 285–91. doi: 10.1038/nature19057.
14. McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016 Jun 6; 17(1): 122. doi: 10.1186/s13059-016-0974-4.
15. Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C.A., Banks E., DePris-to M.A., Handsaker R.E., Lunter G., Marth G.T., Sherry S.T., McVean G., Durbin R.; 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011; 27(15): 2156–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330.
16. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr; 55(4): 611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
17. Charlesworth B. Population Genetics. *Encyclopedia of Biodiversity.* Elsevier; 2013: 182–198. doi:10.1016/B978-0-12-384719-5.00116-7.
18. Solodskikh S.A., Panevina A.V., Gryaznova M.V., Gureev A.P., Serzhantova O.V., Mikhailov A.A., Maslov A.Y., Popov V.N. Targeted sequencing to discover germline variants in the BRCA1 and BRCA2 genes in a Russian population and their association with breast cancer risk. *Mutat Res.* 2019 Jan; 813: 51–57. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2018.12.005.
19. Brugarolas J. Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014 Jun 20; 32(18): 1968–76. doi: 10.1200/JCO.2012.45.2003.
20. Serasanambati M., Chilakapati S.R. Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) in Human Diseases-A Review. *South Indian J Biol Sci.* 2016; 2(4): 368. doi: 10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443.
21. Iqbal N., Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014; 2014: 852748. doi: 10.1155/2014/852748.
22. Krishnamurti U., Silverman J.F. HER2 in Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2014 Mar; 21(2): 100–7. doi: 10.1097/PAP.0000000000000015.
23. Kümler I., Tuxen M.K., Nielsen D.L. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014 Mar; 40(2): 259–70. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.09.002.
24. Bronchud M.H., Castillo S., Escrivá de Romani S., Mourelto S., Fernández A., Baena C., Murillo J., Julia J.C., Esquiús J., Romero R., Andreu X. HER2 Blockade in Metastatic Collecting Duct Carcinoma (CDC) of the Kidney: A Case Report. *Onkologie.* 2012; 35(12): 776–9. doi: 10.1159/000345041.
25. Shen C., Kaelin W.G. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2013 Feb; 23(1): 18–25. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.06.001.

Поступила/Received 16.04.19
Принята в печать/Accepted 24.06.19

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Солодских Сергей Алексеевич, младший научный сотрудник кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (г. Воронеж, Россия). E-mail: s.solodskih@gmail.com. SPIN-код: 5833-6368. ORCID: 0000-0003-3761-6776.

Паневина Анна Викторовна, лаборант, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (г. Воронеж, Россия). SPIN-код: 2356-2166. ORCID: 0000-0002-4721-3447.

Анастасия Геннадьевна Новикова, студент, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (г. Воронеж, Россия).

Дворецкая Юлия Дмитриевна, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (г. Воронеж, Россия). SPIN-код: 1490-1600. ORCID: 0000-0002-5820-1804.

Грязнова Мария Владимировна, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (г. Воронеж, Россия). ORCID: 0000-0003-2076-3868.

Старков Анатолий Анатольевич, PhD, профессор, колледж Уэилл Медикал Корнеллского университета (г. Нью-Йорк, США). AuthorID (РИНЦ): 81262. ORCID: 0000-0002-1334-4828.

Маслов Александр Юрьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», профессор Медицинского колледжа им. Альберта Эйнштейна (г. Воронеж, Россия). SPIN-код: 9137-3622. AuthorID (РИНЦ): 746138.

Михайлов Андрей Анатольевич, кандидат медицинских наук, заместитель главного врача, БУЗ ВО «Воронежский областной клинический онкологический диспансер» (г. Воронеж, Россия).

Хинопулос Кростос, PhD, профессор Университета Земмельвайса (г. Будапешт, Венгрия). Author ID (Scopus): 6602951392. ORCID: 0000-0003-0183-4149.

Попов Василий Николаевич, доктор биологических наук, заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»; ректор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (г. Воронеж, Россия). SPIN-код: 7257-5052. AuthorID (РИНЦ): 88213. ORCID: 0000-0003-1294-8686.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 14.586.21.0062 (уникальный идентификатор договора RFMEFI58618X0062) (В.Н. Попов).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Sergey A. Solodskikh, Junior Researcher, Voronezh State University (Voronezh, Russia). E-mail: s.solodskikh@gmail.com. ORCID: 0000-0003-3761-6776.

Anna V. Panevina, laboratory assistant, Voronezh State University (Voronezh, Russia). ORCID: 0000-0002-4721-3447.

Anastasia G. Novikova, student, Voronezh State University (Voronezh, Russia).

Julia D. Dvoretzkaya, Voronezh State University (Voronezh, Russia). ORCID: 0000-0002-5820-1804.

Maria V. Gryaznova, Voronezh State University (Voronezh, Russia). ORCID: 0000-0003-2076-3868.

Anatoly A. Starkov, PhD, Professor, Cornell University Weill Medical College (New York, USA). ORCID: 0000-0002-1334-4828.

Alexandr Yu. Maslov, PhD, Senior Researcher, Voronezh State University, Professor of College of Medicine Albert Einstein (Voronezh, Russia).

Andrey A. Mikhailov, MD, PhD, Deputy Chief Physician, Voronezh Regional Clinical Oncology Center (Voronezh, Russia).

Kristos Khinolupos, PhD, Professor, Semmelweis University (Budapest, Hungary). ORCID: 0000-0003-0183-4149.

Vasily N. Popov, DSc, Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University (Voronezh, Russia).

Funding

This study was financially supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation 14.586.21.0062 (unique contract identifier RFMEFI58618X0062) (V.N. Popov).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.