

*Иванова Е.А.<sup>1,3\*†</sup>, Гилязова И.Р.<sup>1,2,3†</sup>, Измайлов А.А.<sup>2</sup>, Султанов И.Р.<sup>2</sup>, Сафиуллин Р.И.<sup>2</sup>, Гилязова Г.Р.<sup>2</sup>, Павлов В.Н.<sup>2</sup>, Хуснутдинова Э.К.<sup>1,2,3</sup>*

## **АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ПОЧКИ**

*<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Российская Федерация;*

*<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация;*

*<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация.*

*\*e-mail: lissa987@yandex.ru*

*† авторы внесли равный вклад в работу*

### **Введение**

Рак почки (РП) – это гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство которых представляют собой почечно-клеточные карциномы различных морфологических типов. Ежегодно в мире регистрируют более 300 тысяч новых случаев РП [1]. Ввиду бессимптомного течения рака почки, заболевание зачастую выявляется на поздних стадиях, отягощенных метастазированием. В связи с этим существует явная потребность в углубленном молекулярно-генетическом изучении патогенеза рака почки, что позволит выявить новые молекулярные маркеры для ранней диагностики РП, осуществлять более эффективные оценки риска, проводить отбор пациентов для более агрессивных методов лечения, а также осуществлять выбор молекул, которые будут служить новыми мишенями для лекарственных препаратов.

Основным молекулярно-генетическим событием при развитии рака почки является изменение активности гена-супрессора опухолевого роста фон Хиппеля-Линдау (*VHL*), сопровождающего порядка 70% случаев спорадического рака почки. Наряду с геном *VHL* в патогенезе рака почки задействован ряд генов, вовлеченных в различные молекулярные пути. Ранее нами был проведен анализ экзона у пациентов со светлоклеточным раком почки, в результате которого наиболее патогенные изменения нуклеотидной последовательности были обнаружены в генах пути Notch. Трансмембранные рецепторы семейства Notch осуществляют регуляторные воздействия, влияя на пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, ангиогенез, метастазирование и другие клеточные процессы, индуцирующие возникновение и развитие злокачественных опухолей. Целью данной работы было определение частоты мутаций сигнального пути Notch (*DLL4* (rs35748882), *HEY2* (rs61737181), *JAG1* (rs1801140, rs1801139, rs45575136), *NOTCH1* (rs61751542), *NOTCH2* (rs3795666), *NOTCH4* (rs8192576, rs8192579, rs8192585)), выявленных ранее в результате экзомного секвенирования, в расширенной группе пациентов со светлоклеточным раком почки.

### Материалы и методы

В исследование включено 193 парных образца опухолевой и нормальной ткани почки пациентов со светлоклеточным раком почки. Все обследованные были пациентами клиники Башкирского государственного медицинского университета г. Уфы. Забор образцов тканей и венозной крови проводился сотрудниками кафедры урологии. Исследование одобрено биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики. В исследуемой группе 58,3% пациентов имели начальные стадии заболевания (I-II стадии злокачественного процесса согласно TNM классификации) и 41,7 % пациентов – поздние стадии (III-IV стадии злокачественного процесса согласно TNM классификации). Возраст пациентов варьировал от 37 до 89 лет.

Выделение геномной ДНК из парных образцов опухолевой ткани почки и прилегающей нормальной почечной паренхимы проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Частоту мутаций

определяли в генах пути Notch, выявленных при экзомном секвенировании. Для анализа были отобраны наиболее патогенные варианты с использованием шести *in silico* программ (SIFT, PolyPhen-2, LRT, Mutation Assessor, Mutation Taster, phyloP и GERP++) из dbNSFP v.3.0a. Детекция изменений нуклеотидной последовательности генов осуществлялась с помощью ПЦР с последующим ПДРФ анализом. Ферменты рестрикции были подобраны с помощью интернет-ресурса NEBcutter V2.0 [2].

### Результаты

Нами было проанализировано 10 локусов генов сигнального пути Notch в опухолевой и нормальной ткани почки у 193 пациентов со светлоклеточным раком почки: *DLL4*(rs35748882), *HEY2*(rs61737181), *JAG1* (rs1801140, rs1801139, rs45575136), *NOTCH1*(rs61751542), *NOTCH2*(rs3795666), *NOTCH4*(rs8192576, rs8192579, rs8192585). Показано, что изученные изменения присутствовали только в опухолевой ткани. Частоты мутаций генов пути Notch в исследуемой группе пациентов приведены в таблице.

Таблица 1

Частота изменений нуклеотидной последовательности генов сигнального пути Notch в опухолевой ткани почки у пациентов со светлоклеточным раком почки.

Ген	Частота, n (%)	Средняя частота в популяции
<i>DLL4 c.C1239T</i> (rs35748882)	0/193 (0)	0,01
<i>HEY2 c.G588C</i> (rs61737181)	1/193 (0,51)	0,05
<i>JAG1 c.A2214C</i> (rs1801140)	1/193 (0,51)	0,1
<i>JAG1 c.C1578T</i> (rs1801139)	5/193 (2,59)	0,01
<i>JAG1 c.C924T</i> (rs45575136)	0/193 (0)	0,03
<i>NOTCH1 c.C4129T</i> (rs61751542)	4/193 (2,07)	0,09
<i>NOTCH2 c.C6421T</i> (rs3795666)	0/193 (0)	0,05
<i>NOTCH4 c.T4828C</i> (rs8192576)	3/193 (1,55)	0,05
<i>NOTCH4 c.A5427G</i> (rs8192579)	7/193 (3,62)	0,08
<i>NOTCH4 c.C731T</i> (rs8192585)	2/193 (1,03)	0,02

В среднем частота выявленных изменений в группе пациентов со светлоклеточным раком почки была выше общепопуляционных значений. По клинико-патологическим характеристикам опухоли, в которых были выявлены изучаемые мутации, были разнородны и включали пациентов как с ранними, так и с поздними стадиями. Достоверных ассоциаций частот мутаций с полом и возрастом пациентов также выявлено не было.

Наибольшую частоту встречаемости среди изученных локусов продемонстрировали изменения в генах *NOTCH4* (rs8192579) и *JAG1* (rs1801139). Известно, что активность генов *NOTCH4* и *JAG1* ассоциирована с пролиферацией, инвазией и миграцией клеток, а также с размером опухоли и уровнем ее дифференцировки [3,4]. Кроме того, недавнее исследование продемонстрировало, что мутации в генах сигнального пути Notch могут влиять на эффективность иммунотерапии при светлоклеточном раке почки [5].

### **Выводы**

Полученные в настоящем исследовании результаты могут свидетельствовать о вкладе изученных изменений нуклеотидной последовательности генов сигнального пути Notch в патогенез светлоклеточного рака почки, а также о возможности их использования при создании панели молекулярных маркеров для диагностики и прогноза течения заболевания. Тем не менее, требуются дальнейшие исследования на более крупных группах больных.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации [№ААА-А16-116020350032-1] и за счет средств гранта СПбГУ [ID № 60238366 / № проекта 60257092]. В работе использованы образцы ДНК из «Коллекции биологических материалов человека» ИБГ УФНЦ РАН при поддержке Программы коллекций биоресурсов ФАСО России [Соглашение № 007-030164 / 2].*

### Список литературы

1. Mohammadian M, Pakzad R, Towhidi F, Makhsoosi BR, Ahmadi A, Salehiniya H. Incidence and mortality of kidney cancer and its relationship with HDI (Human Development Index) in the world in 2012. *Clujul Med.* 2017;90(3):286-293.
2. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes // *Nucleic Acids Res.* 2003;31: 3688-3691.
3. Wu K, Xu L, Zhang L, Lin Z, Hou J. High Jagged1 expression predicts poor outcome in clear cell renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2011;41(3):411-6.
4. Bhagat TD, Zou Y, Huang S et al. Notch Pathway Is Activated via Genetic and Epigenetic Alterations and Is a Therapeutic Target in Clear Cell Renal Cancer. *J Biol Chem.* 2017 Jan 20;292(3):837-846. doi: 10.1074/jbc.M116.745208. Epub 2016 Dec 1. PMID: 27909050; PMCID: PMC5247657.
5. Molina-Cerrillo J, Alonso-Gordoa T, Carrato A, Grande E. Hyperprogression to a dual immune blockade followed by subsequent response with cabozantinib in metastatic poor-risk clear cell renal cell carcinoma with NOTCH mutation. *Oncotarget.* 2020;11(22):2137-2140.