

12. Tyuzikov, I.A. Optimizaciya diagnostiki zabolevaniy jedinstvennoy pochki u muzhchin na osnovе mezhdisciplinarnogo podhoda / I.A. Tyuzikov, A. P. Ivanov // Klinicheskaya nefrologiya. – 2013. – № 2. – S. 25-29. (In Russ.).
13. Tyuzikov, I.A. Sistemnyy metabolicheskiy faktor patogeneza zabolevaniy jedinstvennoy pochki u muzhchin (pilotnoye issledovanie) / I.A. Tyuzikov, A. P. Ivanov // Urologiya. – 2012. – № 3. – S. 11-14. (In Russ.).
14. SHormanov, I.S. Farmakologicheskaya podderzhka adaptivnykh vozmozhnostey organizma v usloviya eksperimental'noy kooperatsionnoy stressa / I.S. SHormanov [i dr.] // Medicinskiy vestnik Bashkortostana. – 2016. – Tom. 11, № 2 (62). – S. 47-52
15. Guzmán, D.C. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21052943> / D.C. Guzmán [et al.] // Arch Pharm Res. – 2010. – 33(10). C 1671-1677. (In Russ.).
16. Kérdő, I. Einaus Daten der Blutzirkulation kalkulierter Index zur Beurteilung der vegetativen Tonuslage / I. Kérdő // Acta neurovegetativa. – 1966. – Bd. 29 (2). P. 250-268.
17. Kolik, L.G. Efficacy of peptide anxiolytic selank during modeling of withdrawal syndrome in rats with stable alcoholic motivation / L.G. Kolik, A.V. Nadorova, M.M. Kozlovskaya // Bull Exp Biol Med. – 2014. – 157(1). P. 52-55.
18. Kurra, V. Hyperuricemia, oxidative stress, and carotid artery tone in experimental renal insufficiency / V. Kurra [et al.] // Am J Hypertens. – 2009. – 22(9). P. 964-970.
19. Kvetnansky, R. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems / R. Kvetnansky, X. Lu, M.G. Ziegler // Adv Pharmacol. – 2013. – 68. P. 359-397.
20. Levin, O. Phyto-adaptogens--protection against stress? / O. Levin // Harefuah. – 2015. – 154(3). P. 183-186.
21. Zung, W.W.K. A rating instrument for anxiety disorders / W.W.K. Zung // Psychosomatics. – 1971. – 12. P. 371-379.

УДК 575:618

© Коллектив авторов, 2020

И.Р. Гилязова^{1,2,3}, М.А. Бермишева^{1,3}, Е.А. Климентова^{1,3},
Р.И. Сафиуллин², А.А. Измайлов², В.Н. Павлов², Э.К. Хуснутдинова^{1,2,3}
**АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ СИНДРОМА ВЕРНЕРА
У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ ПОЧКИ**

¹ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Ген WRN участвует в репликации, репарации, рекомбинации и поддержании теломера. Биаллельная инактивация гена приводит к развитию синдрома Вернера.

Цель: осуществить скрининг мутации гена WRN*p.R1406X больных метастатическим раком почки.

Материал и методы. В исследование было включено 67 больных метастатическим раком почки основной и 445 индивидов контрольной группы. Детекцию мутаций гена WRN проводили с помощью анализа кривых плавления (HRM) на приборе CFX96 Real-Time PCR Analyzer (BioRad) с применением красителя Eva Green.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного скрининга среди пациентов с метастатическим раком почки мутация WRN*p.R1406X не идентифицирована. Поиск данной мутации в группе контроля позволил выявить шесть индивидов, носителей мутантного варианта p.R1406X в гене WRN (1,35%). В экзоне 4-го гена WRN у 44 пациентов с раком почки (65,6%) обнаружена миссенс-мутация – замена валина на изолейцин p.V114I, которая согласно анализу функциональной значимости по 10 предсказательным программам, обладает низкой степенью патогенности.

Выводы. Показано, что мутация WRN*p.R1406X не является причиной развития метастатического рака почки.

Ключевые слова: метастатический рак почки, синдром Вернера, ген WRN, мутация.

I.R. Gilyazova, M.A. Bermisheva, E.A. Klimentova,
R.I. Safiullin, A.A. Izmailov, V.N. Pavlov, E.K. Khusnutdinova
**ANALYSIS OF MUTATIONS IN THE WERNER SYNDROME GENE
IN METASTATIC RENAL CANCER PATIENTS**

The WRN gene is involved in replication, repair, recombination, and telomere support. Biallelic inactivation results in the development of Werner syndrome.

Objective. To screen the mutation WRN * p. R1406X in patients with metastatic kidney cancer.

Material and methods. The study included 67 metastatic renal cancer patients and 445 control individuals. Detection of WRN gene mutations was performed using melting curve analysis (HRM) on the CFX96 Real-Time PCR Analyzer (Bio Rad) using the Eva Green dye.

Results and discussion. As a result of the screening WRN *c.R1406X mutation wasn't revealed among patients with metastatic kidney cancer. The search for this mutation in the control group revealed six individuals who carried the mutant variant WRN *c.R1406X (1.35%) in the Russian group. In exon 4 of the WRN gene in 44 patients with renal cancer (65.6%) we found a missense mutation p. V114I. According to the analysis of functional significance using 10 predictive programs, p. V114I has a low degree of pathogenicity.

Conclusion. It is shown that the WRN *c.R1406X mutation is not the cause of metastatic renal cancer.

Key words: metastatic renal cancer, Werner syndrome, WRN gene, mutation.

Онкоурологические заболевания являются серьезной медицинской, социальной и экономической проблемой [1-3]. В их патогенезе особое внимание уделяется ряду генов, супрессоров опухолевого роста, участвующих в подавлении активности онкогенов. Известно, что

изменение активности данных генов может приводить к развитию и прогрессированию опухоли. Одним из таких генов является ген WRN. Продукт гена WRN/RECQL2 играет важную роль в репликации ДНК и поддержании целостности генома. Инактивация обеих аллелей

лей гена WRN приводит к синдрому Вернера – редкому аутосомно-рецессивному расстройству, характеризующемуся ранним появлением многочисленных симптомов и заболеваний, связанных со старением, в том числе рака. Мутации в гене WRN могут приводить к синтезу укороченных белков, которые не могут локализоваться в ядре, или эти мутации в гене способны дестабилизировать белок, обладающий геликазной и экзонуклеазой активностью [4].

Хотя мутации в гене WRN напрямую не связаны с онкоурологическими заболеваниями, существуют работы, посвященные анализу генов WRN и RECQL5 при онкологических заболеваниях мочеполовой системы [5,6]. Учитывая то, что поиск мутаций в данном гене у пациентов с онкоурологическими заболеваниями и у здоровых индивидов из РФ ранее не проводился, целью данного исследования являлся анализ мутаций в гене WRN для идентификации их роли в развитии метастатического рака почки.

Материал и методы

В работе использованы образцы периферической крови пациентов с первично-выявленным метастатическим раком почки и гистологически подтвержденным диагнозом светлоклеточный рак почки (N=67). Исследование было одобрено локальным биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН. В качестве контрольной группы в исследование включены здоровые индивиды, первостепенные родственники которых не имели онкологических заболеваний (N=445). Забор материала осуществлялся сотрудниками кафедры урологии клиники БГМУ. Все пациенты охарактеризованы по гистологическому типу опухоли, TNM-классификации и стадии заболевания.

Детекцию мутаций гена WRN проводили с помощью высокоточного анализа кинетики плавления продуктов амплификации (HRM) на приборе CFX96 Real-Time PCR Analyzer (BioRad). В каждый эксперимент были включены положительный и отрицательный контроли. В качестве положительного контроля использовали образец ДНК с идентифицированной ранее мутацией p.R1406X [4].

Анализ функциональной значимости выявленных изменений проводили с использованием *in silico* предсказательных программ (SIFT, PolyPhen-2, LRT, Mutation Assessor, MutationTaster, phyloP, GERP++, PROVEAN, VEST3, MetaSVM) из dbNSFP v.3.0a.

Результаты и обсуждение

Мы провели скрининг WRN*p.R1406X у 67 больных метастатическим раком почки и у 445 здоровых лиц для оценки частоты гете-

розиготного носительства данной мутации в нашем регионе у лиц русской, татарской и башкирской этнической принадлежности. Генотипирование было успешно проведено на всех образцах ДНК, но среди пациентов с метастатическим раком почки мутация WRN*p.R1406X не идентифицирована. Поиск данной мутации в группе контроля (n=445) позволил выявить (%) в группе русских шесть индивидов – носителей мутантного варианта p.R1406X в гене WRN (1,35).

В экзоне 4-го гена WRN у 44 (65,6%) пациентов с раком почки обнаружена миссенс-мутация (замена валина на изолейцин p.V114I), которая, согласно анализу функциональной значимости по 10 предсказательным программам, обладает низкой степенью патогенности.

Известно, что изменения нуклеотидной последовательности в гене WRN сопровождаются развитием злокачественных опухолей различных типов. Так, распространенность дефицита гомологичной рекомбинации с повреждением ДНК (HR-DDR), в том числе гена WRN, свойственна для большого количества опухолевых линий [7].

В исследовании [6] показана ассоциация WRN* Leu1074Phe с риском развития рака предстательной железы у китайских мужчин. Кроме того, при раке предстательной железы описана новая герминальная мутация G327X [8]. Кроме того, выявлена корреляция редкого генотипа Arg/Arg WRN Cys1367Arg с увеличением риска развития рака молочной железы. В результате полногеномного секвенирования в гене WRN был установлен высокопатогенный вариант c.4108delA (p.N1370Tfs*23) у родственных индивидов с отягощением в виде различных типов злокачественных опухолей (рак легкого, эндометриальный рак). Ранее нами было выявлено, что вариант мутации гена WRN*p.R1406X не вносит вклад в риск развития рака молочной железы [4]. Данное исследование также не подтвердило ассоциацию обнаруженных нами мутаций в гене WRN с раком почки.

Заключение

Исследованиями последних лет показано, что WRN связывается с множеством других белков, включая RPA, DNA-PKcs и TRF2, позволяющих предположить, что WRN участвует в репликации, репарации, рекомбинации и поддержании теломер ДНК. Кроме того, выявлено, что истощение WRN индуцирует разрывы двухцепочечной ДНК и стимулирует апоптоз и остановку клеточного цикла в моделях микросателлитной нестабильности (MSI) [9]. Результаты, полученные в нашем исследовании, дока-

зывают, что варианты мутации WRN*р.Р1406Х и WRN*р.В114I не вносят вклад в развитие рака почки. Несомненно, необходимо проведение исследований для выявления новых мутаций в гене WRN и уточнения значения геликазы в развитии урологических злокачественных опухолей, в том числе рака почки.

Работа заняла призовое место в конкурсе научно-исследовательских работ, проводимом в рамках проекта № 20-015-20013

организации Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты иммунологии, генетики и инфектологии», получившего поддержку ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» (РФФИ). Исследование выполнено при поддержке РФФИ № 17-44-020050 р_а, а также с использованием оборудования ЦКП «Биомика» и УНУ «КОДИНК».

Сведения об авторах статьи:

Гильязова Ирина Ришатовна – к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УФИЦ РАН; доцент кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, с.н.с. ФГБОУ ВО СПбГУ. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. E-mail: gilyasova_irina@mail.ru.

Бермишева Марина Алексеевна – к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УФИЦ РАН, с.н.с. ФГБОУ ВО СПбГУ. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. E-mail: berm_marina@mail.ru.

Климентова Елизавета Алексеевна – м.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УФИЦ РАН, н.с. ФГБОУ ВО СПбГУ. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. E-mail: lissa987@yandex.ru.

Сафиуллин Руслан Ильясевич – д.м.н., профессор кафедры урологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: 021gen@mail.ru.

Измайлов Альберт Аделевич – студент 6 курса ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: 021gen@mail.ru.

Павлов Валентин Николаевич – член-корр. РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой урологии, ректор ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел. 8(347)272-41-73. E-mail: vrpavlov3@yandex.ru.

Хуснутдинова Эльза Камилевна – д.б.н., профессор, и.о. директора Института биохимии и генетики УФИЦ РАН, заведующая кафедрой медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, главный научный сотрудник ФГБОУ ВО СПбГУ. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. E-mail: elzakh@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роль генетических факторов в формировании злокачественных новообразований мочевого пузыря / В.Н. Павлов [и др.] // Онкоурология. – 2008. – Т.2, №4. – С.35-39. DOI: 10.17650/1726-9776-2008-4-2-35-39
2. Генетические факторы риска развития рака мочевого пузыря / В. Н. Павлов [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2010. – №. 2. – С. 30-33.
3. Хасанова, Г.М. Социально-медицинская работа в различных сферах жизнедеятельности / Г.М. Хасанова, З.Л. Сизоненко, З.А. Янгуразова – Уфа: РИЦ БашГУ, 2010. – 191 с.
4. Нонсенс-мутация р.Р1406Х гена WRN не является фактором риска развития рака молочной железы / М.А. Бермишева [и др.] // Генетика. – 2019. – Т. 55, № 7. – С. 826-831.
5. Altered RECQL5 expression in urothelial bladder carcinoma increases cellular proliferation and makes RECQL5 helicase activity a novel target for chemotherapy / K. Patterson [et al.] // Oncotarget. – 2016. – Vol.7, №46. – P. 76140-76150. DOI: 10.18632/oncotarget.12683.
6. Single nucleotide polymorphism WRN Leu1074Phe is associated with prostate cancer susceptibility in Chinese subjects / L. Wang [et al.] // Acta Med Okayama. – 2011. – Vol.65, №5. – P.315-23.
7. Prevalence of homologous recombination-related gene mutations across multiple cancer types / A.L. Heeke [et al.] // JCO Precis Oncol. – 2018. doi: 10.1200/PO.17.00286.
8. Prostatic carcinoma with neuroendocrine differentiation harboring the EWSR1-FEV fusion transcript in a man with the WRN G327X germline mutation: A new variant of prostatic carcinoma or a member of the Ewing sarcoma family of tumors? / C.A. Febres-Aldana [et al.] // Pathol Res Pract. – 2020. – Vol.216, №2. – P.152758. doi: 10.1016/j.prp.2019.152758.
9. WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. / E.M. Chan [et al.] // Nature. – 2019. – Vol.568, №7753. – P.551-556. doi: 10.1038/s41586-019-1102-x.

REFERENCES

1. Pavlov V.N., Izmaylova S.M., Izmaylov A.A., Viktorova T.V. Role of the genetic factors in the formation of malignant neoplasia of urinary bladder. Cancer Urology. 2008;4(2):35-39. (In Russ.) <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2008-4-2-35-39>
2. V.N. Pavlov, A.A. Izmailov, T.V. Viktorova, S. M. [et al.]. Bladder cancer genetic risk factors.//Experimental and clinical urology. 2010; (2): 30-33. (in Russ.)
3. Khasanova, G.M. Sotsial'no-meditsinskaya rabota v razlichnykh sferakh zhiznedeiatel'nosti (Socio-medical work in various fields of life) / G.M. Khasanova, Z.L. Sizonenko, Z.A. Yangurazova – Ufa: RITs BashGU, 2010. – 191 s. (in Russ.)
4. Bermisheva, M.A., Gilyazova, I.R., Akhmadishina, L.Z. [et al.]. A WRN Nonsense Mutation, p.R1406X, is Not a Risk Factor of Breast Cancer. Russ J Genet 55, 899–903 (2019). (In Russ.) <https://doi.org/10.1134/S1022795419070056>
5. Patterson, K., Arya, L., Bottomley, S. [et al.]. Altered RECQL5 expression in urothelial bladder carcinoma increases cellular proliferation and makes RECQL5 helicase activity a novel target for chemotherapy. Oncotarget. 2016; 7(46), 76140-76150. (in Eng.) DOI: 10.18632/oncotarget.12683.
6. Wang, L., Kaku, H., Huang, P. [et al.]. Single nucleotide polymorphism WRN Leu1074Phe is associated with prostate cancer susceptibility in Chinese subjects. Acta Med Okayama. 2011; 65(5), 315-23. (in Eng.)
7. Heeke, A.L., Pishvaian, M.J., Lynce, F. [et al.]. Prevalence of homologous recombination-related gene mutations across multiple cancer types. JCO Precis Oncol. 2018; 2018. doi: 10.1200/PO.17.00286. Epub 2018 Jul 23 (in Eng.)
8. Febres-Aldana, C.A., Krishnamurthy, K., Delgado, R. [et al.]. Prostatic carcinoma with neuroendocrine differentiation harboring the EWSR1-FEV fusion transcript in a man with the WRN G327X germline mutation: A new variant of prostatic carcinoma or a member of the Ewing sarcoma family of tumors? // Pathol Res Pract. 2020; 216(2), 152758. (in Eng.) doi: 10.1016/j.prp.2019.152758.
9. Chan, E.M., Shibue, T., McFarland, J.M. [et al.]. WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. Nature. 2019 Apr;568(7753):551-556. (in Eng.) doi: 10.1038/s41586-019-1102-x. Epub 2019 Apr 10.