

DOI 10.31718/2077-1096.20.2.119

УДК 616.6-006:577.213/.216

Волкогон А.Д., Гарбузова В.Ю., Атаман О.В.

ПОЛІМОРФНИЙ САЙТ RS3200401 ГЕНУ MALAT1 НЕ АСОЦІЙОВАНИЙ ІЗ ВІКОМ ВИНИКНЕННЯ РАКУ НИРКИ

Сумський державний університет

На сьогодні довга некодуюча РНК MALAT1 вважається однією із основних РНК, причетних до виникнення та метастазування злоякісних пухлин різної локалізації. Результати нещодавніх експериментів показали, що MALAT1 відіграє важливу роль у настанні та прогресії і раку нирки. При цьому було виявлено, що виживаність онкохворих залежить від рівня експресії гена цієї РНК. Метою дослідження стало вивчення можливого зв'язку rs3200401-поліморфізму гена MALAT1 із віком виникнення раку нирки в українських пацієнтів. Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведено із використанням венозної крові 101 хворого зі світлоклітинним нирково-клітинним раком (42 жінки та 59 чоловіків). Визначення rs3200401 поліморфізму гена MALAT1 здійснювали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням компонентів TaqMan SNP Assay C_3246069_10. Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програми SPSS (версія 17.0). Методики Каплана-Мейєра та Кокс-регресія були застосовані для перевірки можливої асоціації між rs3200401-генотипами та віком виникнення раку нирки. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними. Результати. Результати генотипування за поліморфним сайтом rs3200401 гена MALAT1 показали, що серед пацієнтів із нирково-клітинним раком 71 (70,3 %) особа мала генотип CC, 29 (28,7 %) – генотип CT, 1 (1 %) – генотип TT. Аналіз виживаності методом Каплана-Мейєра показав, що тривалість життя до моменту виникнення пухлини не пов'язана із rs3200401-локусом ($\log \text{rank } P = 0,449$ – для кодомінантної моделі; $\log \text{rank } P = 0,847$ – для домінантної моделі). Результати аналізу за допомогою регресії Кокса також показали, що ризик розвитку нирково-клітинної карциноми з віком не залежить від rs3200401-сайту гена MALAT1 ($P > 0,05$). Статистично достовірні результати не були виявлені і після врахування статі, індексу маси тіла пацієнтів, наявності в них метастазів, звички палити та вживати алкоголь ($P > 0,05$). Висновки. В українській популяції поліморфізм rs3200401 гена довгої некодуючої РНК MALAT1 не пов'язаний із віком настання раку нирки.

Ключові слова: довга некодуюча РНК, MALAT1, поліморфізм генів, рак нирки.

Дослідження є фрагментом НДР «Роль алейного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб» (№ державної реєстрації – 0110U005038).

Вступ

На сьогодні відомо, що основна частка транскриптів, що утворюються в ядрі клітин людини, представлена некодуючими РНК, які регулюють експресію більше 70 % генів людини [1]. Залежно від довжини некодуючої молекули РНК розділяють на короткі (менше ніж 200 нуклеотидів) та довгі (більше ніж 200 нуклеотидів). У той час, як вже описано вплив коротких версій цих молекул, особливо мікроРНК, на розвиток різноманітних пухлин шляхом пригнічення експресії мРНК, вплив довгих некодуючих РНК є менш дослідженим [2].

Особливу увагу вчених багатьох лабораторій сьогодні привертає довга некодуюча РНК (днРНК) MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript), також відома як NEAT2 (noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2) [3]. Результати низки досліджень показали зв'язок зміни експресії MALAT1 із виникненням та розвитком різних видів злоякісних пухлин, включаючи рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак печінки, нейробластоми, остеосаркому, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак шлунку та рак легень [4, 5].

Разом із цим одним із напрямів сучасної молекулярної біології є дослідження ролі lncRNA

MALAT1 у патогенезі злоякісних новоутворень нирки. Результати експериментальних робіт Zhang et al. [6] та Hirata et al. [7] показали, що в клітинах нирково-клітинного раку (НКР) спостерігається надмірне утворення молекули MALAT1. Групою Ye et al. встановлено, що MALAT1 сприяє пухлинній прогресії НКР шляхом пригнічення активності miR-194-5p [8]. А результати роботи Kulkarni et al. продемонстрували, що активація miR-182-5p призводить до зупинки росту пухлин НКР шляхом пригнічення експресії MALAT1 [9]. Також цікаво відмітити, що хворі із НКР із високим рівнем експресії MALAT1 в біоптатах пухлин мають значно менший показник загальної виживаності, ніж пацієнти із низьким рівнем утворення транскриптів MALAT1 [6, 7].

Таким чином, враховуючи вагому роль днРНК MALAT1 у виникненні та прогресії раку нирки, а також залежність часу життя хворих із НКР від рівня експресії MALAT1, цікавим буде дослідити можливий зв'язок генетичного поліморфізму MALAT1 із виживаністю пацієнтів із злоякісними новоутвореннями нирок.

Мета дослідження

Вивчення можливої асоціації rs3200401- поліморфізму гена lncRNA MALAT1 із віком настання раку нирки в українських пацієнтів.

Матеріали і методи дослідження.

Дослідження проведено із використанням венозної крові 101 хворого зі світлоклітинним нирково-клітинним раком (СКНKP) (42 жінки та 59 чоловіків). Пацієнти спостерігались на базі Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру з 2005 по 2016 рік. Кінцевий діагноз СКНKP встановлювався відповідно до рекомендацій Європейської асоціації урологів (European Association of Urology Guidelines). Усі хворі мали II клінічну стадію раку відповідно до TNM-класифікації злоякісних пухлин.

Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000) та Наказу МОЗ України №690 від 23.09.2009 р. Усі учасники підписали інформовану згоду на участь у дослідженнях з наступним забором венозної крові на генетичний аналіз.

Визначення rs3200401 поліморфізму гена MALAT1 здійснювали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (Real-Time PCR) з використанням компонентів TaqManSNP Assay C_3246069_10. Режим для проведення ампліфікації: первинна денатурація 20 с при 95°C, денатурація 30 с при 95°C та відпал з елонгацією – 30 с при 60°C (всього 50 циклів). Ампліфікація та аналіз отриманих результатів проводилися детекторним модулем 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) з використанням 7500 Fast Real-time PCR Software.

Математичне опрацювання даних проводили за допомогою програми SPSS (версія 17.0). Безперервні дані наведені у вигляді середнього значення \pm SD. Перевірку відповідності розподілу алелів за rs3200401-локусом рівноваги Харді-Вайнберга проводили за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Методики Каплана-Мейера та Кокс-

регресія були застосовані для перевірки можливої асоціації між rs3200401-генотипами та віком виникнення СКНKP. Регресія Кокса була виконана як без, так із поправкою на стать, індекс маси тіла, наявність метастазів, звичку палити та вживати алкоголь. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати генотипування за поліморфним сайтом rs3200401 гена MALAT1 показали, що серед пацієнтів із СКНKP 71 (70,3 %) особа має генотип CC, 29 (28,7 %) – генотип CT, 1 (1 %) – генотип TT. Частота основного (C) та рецесивного (T) алелів становила 0,85 та 0,15 відповідно, а їх розподіл не відхилявся від рівноваги Харді-Вайнберга ($P > 0,05$).

У таблиці 1 наведені показники середнього віку настання СКНKP в осіб із різним генотипом за rs3200401-локусом гена MALAT1 (у рамках кодомінантної та доміантної моделей успадкування). На рисунку 1 представлена крива функції ризику, що в рамках доміантної моделі успадкування ілюструє залежність між ймовірністю настання СКНKP та віком пацієнтів із різними генотипами за поліморфізмом rs3200401 гена MALAT1. Аналіз виживаності методом Каплана-Мейера показав, що тривалість життя до моменту розвитку СКНKP не асоційована із поліморфним сайтом rs3200401 ($\log \text{rank } P = 0,449$ – для кодомінантної моделі; $\log \text{rank } P = 0,847$ – для доміантної моделі).

Результати аналізу ризику виникнення СКНKP залежно від конкретного генотипу за rs3200401-поліморфізмом методом регресії Кокса показані в таблиці 2. У рамках одноваріантного аналізу встановлено, що ризик розвитку СКНKP з віком не залежав від досліджуваного локусу гена MALAT ($P > 0,05$). Статистично значущі результати також не були виявлені і після поправки на стать, індекс маси тіла, наявність метастазів, звичку палити та вживати алкоголь ($P > 0,05$).

Таблиця 1
Аналіз зв'язку віку настання СКНKP із rs3200401-поліморфізмом гену MALAT1

Генотип	n	Середній вік	SE	95 % CI	log rank P	Breslow P
Кодомінантна модель						
CC	71	56,3	1,3	53,8-58,7	0,449	0,439
CT	29	55,9	1,8	52,4-59,4		
TT	1	74,0	0,0	74,0-74,0		
Домінантна модель						
CC	71	56,3	1,3	53,8-58,7	0,847	0,685
CT+TT	30	56,5	1,8	52,9-60,1		

Примітка: СКНKP – світлоклітинний нирково-клітинний рак;

SE – стандартна похибка; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; n – кількість пацієнтів

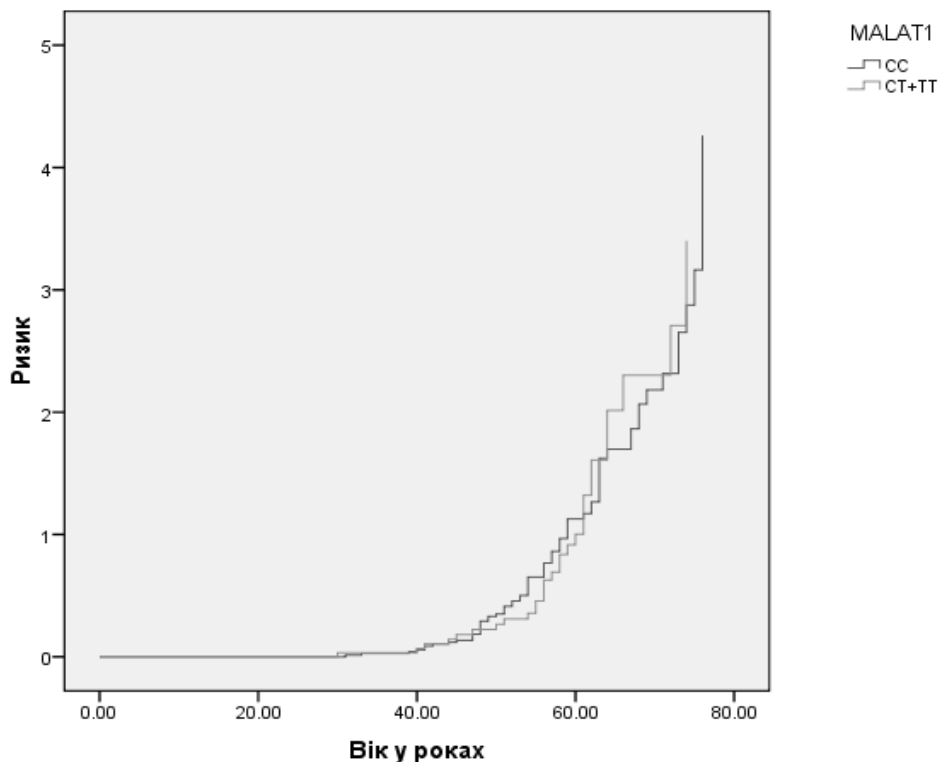


Рис 1. Функція ризику виникнення СКНKP залежно від віку в осіб із різними генотипами за поліморфним сайтом rs3200401 гену MALAT1.

Таблиця 2
Аналіз зв'язку між rs320040-поліморфізмом гену MALAT1 та ризиком виникнення СКНKP з віком

Модель	Одноваріантний аналіз			Мультиваріабельний аналіз		
	HR	95 % CI	P	HR	95 % CI	P
TT+CT vs CC	2 1,04	0,677-1,603	3 0,85	3 1,02	0,656-1,595	2 0,92
CT vs TT+CC	4 1,14	0,738-1,772	7 0,54	0 1,08	0,684-1,707	0 0,74
TT vs CT+CC	6 0,34	0,048-2,505	3 0,29	7 0,46	0,061-3,595	4 0,46

Примітка: СКНKP – світлоклітинний нирково-клітинний рак; HR – ризик небезпеки; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал.

Узагальнення результатів експериментальних робіт останніх років показало, що днРНК відіграють одну із головних ролей у різноманітних внутрішньоклітинних процесах, а рівень їх продукції специфічно асоційований із виникненням злоякісних пухлин [10], включаючи і рак нирок [11]. Серед багатьох некодуючих РНК, причетних до патогенезу злоякісних пухлин нирок, особливу увагу сьогодні привертає днРНК MALAT1.

Поряд із вивченням ролі MALAT1 у розвитку раку нирок на сьогодні також виконані декілька досліджень зв'язку цієї днРНК із виживаністю пацієнтів. Так, у роботі Zhang et al. [6] показано, що високий показник експресії MALAT1 у хворих СКНKP був пов'язаний із більшою кількістю ускладнень та меншим показником виживаності. Поряд із цим, Hirata et al. [7] також виявили негативну кореляцію між кількістю утворених транс-

криптів MALAT1 та ймовірністю вижити у пацієнтів із СКНKP.

У нашій роботі був проведений аналіз можливого зв'язку між генетичним поліморфізмом MALAT1 та віком настання СКНKP. Ген днРНК MALAT1 розташовується на довгому плечі 11-ї хромосоми (11q13.1), складається із 8708 пар основ та містить 2 екзони [12]. Станом на березень 2020 року відомо 5730 поліморфних сайтів гену MALAT1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=MALAT1>). Одним із найбільш клінічно значущих у контексті зв'язку із розвитком злоякісних пухлин є поліморфний сайт rs3200401, що і був обраний нами для дослідження.

Результати, отримані під час нашого дослідження, показали, що rs3200401-поліморфізм не пов'язаний із віком виникнення СКНKP в українських пацієнтів. Такі результати були виявлені в

умов як без, так і з урахуванням таких факторів, як стать, куріння, наявність метастазів, індекс маси тіла та зловживання алкоголем. На сьогодні дослідження такого плану в інших популяціях ще не виконувались. Проте, колективом Wang et al. [13] під час вивчення асоціації генетичного поліморфізму *MALAT1* із виживаністю китайських пацієнтів із аденокарциномою легень було встановлено, що пацієнти із СТ- та ТТ-генотипами за rs3200401-локусом мають значно більший показник часу виживаності та менший ризик смертності, порівняно із хворими, що мають генотип СС.

Висновки

В українській популяції поліморфізм rs3200401 гена довгої некодируючої РНК *MALAT1* не пов'язаний із віком настання раку нирки.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні можливого зв'язку поліморфних сайтів генів *ANRIL* і *HOTAIR* із показниками виживаності у хворих із раком нирки.

Література

1. Fernandes JC, Acuña SM, Aoki JI, Floeter-Winter LM, Muxel SM. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA*. 2019;5(1):E17. doi: 10.3390/ncrna5010017.
2. Mattick JS. The State of Long Non-Coding RNA Biology. *Noncoding RNA*. 2018;4(3):E17. doi: 10.3390/ncrna4030017.
3. Ma XY, Wang JH, Wang JL, Ma CX, Wang XC, Liu FS. MALAT1 as an evolutionarily conserved lncRNA, plays a positive role in

- regulating proliferation and maintaining undifferentiated status of early-stage hematopoietic cells. *BMC Genomics*. 2015;16(1):676. doi: 10.1186/s12864-015-1881-x.
4. Li ZX, Zhu QN, Zhang HB, Hu Y, Wang G, Zhu YS. MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6757-6768. doi: 10.2147/CMAR.S169406.
5. Zhao M, Wang S, Li Q, Ji Q, Guo P, Liu X. MALAT1: A long non-coding RNA highly associated with human cancers. *Oncol Lett*. 2018;16(1):19-26. doi: 10.3892/ol.2018.8613.
6. Zhang HM, Yang FQ, Chen SJ, Che J, Zheng JH. Upregulation of long non-coding RNA MALAT1 correlates with tumor progression and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2015;36(4):2947-2955. doi: 10.1007/s13277-014-2925-6.
7. Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, Deng G, Nakajima K, Tabatabai ZL et al. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Renal Cell Carcinoma through Ezh2 and Interacts with miR-205. *Cancer Res*. 2015;75(7):1322-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2931.
8. Ye Y, Zhang F, Chen Q, Huang Z, Li M. LncRNA MALAT1 modified progression of clear cell kidney carcinoma (KIRC) by regulation of miR-194-5p/ACVR2B signaling. *Mol Carcinog*. 2019;58(2):279-292. doi: 10.1002/mc.22926.
9. Kulkarni P, Dasgupta P, Bhat NS, Shahryari V, Shiina M, Hashimoto Y et al. Elevated miR-182-5p Associates with Renal Cancer Cell Mitotic Arrest through Diminished MALAT-1 Expression. *Mol Cancer Res*. 2018;16(11):1750-1760. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0762.
10. Kim MY. Long non-coding RNAs in cancer. *Noncoding RNA Res*. 2019;4(2):45. doi: 10.1016/j.ncrna.2019.02.003.
11. Li M, Wang Y, Cheng L, Niu W, Zhao G, Raju JK et al. Long non-coding RNAs in renal cell carcinoma: A systematic review and clinical implications. *Oncotarget*. 2017; 8(29): 48424-48435. doi: 10.18632/oncotarget.17053.
12. Wu Y, Huang C, Meng X, Li J. Long Noncoding RNA MALAT1: Insights into its Biogenesis and Implications in Human Disease. *Curr Pharm Des*. 2015;21(34):5017-5028.
13. Wang JZ, Xiang JJ, Wu LG, Bai YS, Chen ZW, Yin XQ et al. A genetic variant in long non-coding RNA MALAT1 associated with survival outcome among patients with advanced lung adenocarcinoma: a survival cohort analysis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):167. doi: 10.1186/s12885-017-3151-6.

Реферат

ПОЛИМОРФНЫЙ САЙТ rs3200401 ГЕНА *MALAT1* НЕ АССОЦИИРОВАН С ВОЗРАСТОМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАКА ПОЧКИ
Волкогон А. Д., Гарбузова В. Ю., Атаман О. В.

Ключевые слова: длинная некодирующая РНК, MALAT1, полиморфизм генов, рак почки.

Сегодня длинная некодирующая РНК MALAT1 считается одной из основных РНК, причастных к возникновению и метастазированию злокачественных опухолей различной локализации. Результаты недавних экспериментов показали, что MALAT1 играет важную роль в наступлении и прогрессии также и рака почки. При этом было обнаружено, что выживаемость онкобольных зависит от уровня экспрессии гена этой РНК. Целью исследования стало изучение возможной связи rs3200401-полиморфизма гена *MALAT1* с возрастом возникновения рака почки среди украинских пациентов. Материалы и методы исследования. Исследование проведено с использованием венозной крови 101 больного с светлоклеточным почечно-клеточным раком (42 женщины и 59 мужчин). Определение rs320040-полиморфизма гена *MALAT1* осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием компонентов TaqMan SNP Assay C_3246069_10. Статистический анализ данных проводили с помощью программы SPSS (версия 17.0). Методики Каплана-Мейера и Кокс-регрессия были применены для проверки возможной ассоциации между rs3200401-генотипами и возрастом возникновения рака почки. Значение $P < 0,05$ считали статистически значимыми. Результаты. Результаты генотипирования по полиморфному сайту rs3200401 гена *MALAT1* показали, что среди пациентов с почечно-клеточным раком 71 (70,3%) человек имел генотип СС, 29 (28,7%) – генотип СТ, 1 (1%) – генотип ТТ. Анализ выживаемости методом Каплана-Мейера показал, что продолжительность жизни до момента возникновения опухоли не связана с rs3200401-локусом ($\log \text{rank } P = 0,449$ – для кодоминантной модели; $\log \text{rank } P = 0,847$ – для доминантной модели). Результаты анализа с помощью регрессии Кокса также показали, что риск развития почечно-клеточного рака с возрастом не зависит от rs3200401-сайта гена *MALAT1* ($P > 0,05$). Статистически достоверные результаты не были обнаружены и после учета пола, индекса массы тела пациентов, наличия у них метастазов, привычки курить и употреблять алкоголь ($P > 0,05$). Выводы. В украинской популяции полиморфизм rs3200401 гена длинной некодирующей РНК *MALAT1* не связан с возрастом наступления рака почки.

Summary

rs3200401 *MALAT1* GENE POLYMORPHISM IS NOT RELATED TO AGE OF KIDNEY CANCER ONSET

Volkohon AD, Harbuzova V. Yu., Ataman OV

Key words: long non-coding RNA, MALAT1, gene polymorphism, kidney cancer.

Today, the long non-coding RNA MALAT1 is considered to be one of the major RNAs involved in the emergence and metastasizing of various malignant tumours. Recent experiments have shown that MALAT1 plays an important role in the onset and progression of kidney cancer as well. It was found that cancer patient survival depends on the level of *MALAT1* gene expression. The aim of the study was to investigate the possible association between rs3200401 *MALAT1* gene polymorphism and age of kidney cancer onset among Ukrainian patients. Materials and methods. The venous blood of 101 patients with clear cell renal cell carcinoma (42 women and 59 men) was used for study. Determination of *MALAT1* gene rs320040 polymorphism was performed by the Real-Time polymerase chain reaction method using TaqManSNP Assay C_3246069_10 components. Statistical analysis of the data obtained was performed using SPSS (version 17.0). To test the possible association between rs3200401 genotypes and the age of kidney cancer onset Kaplan-Meier and Cox regression techniques were used. P value < 0.05 was considered as statistically significant. Results. The obtained results of *MALAT1* gene rs3200401 polymorphic site genotyping revealed that 71 (70.3%) patients with renal cell carcinoma had CC genotype, 29 (28.7%) – CT, 1 (1%) – TT genotype. Survival analysis by Kaplan-Meier method showed that life expectancy until the tumour occurrence was not related to rs3200401 locus (log rank P = 0.449 – for codominant model; log rank P = 0.847 – for dominant model). The results of Cox regression analysis also showed no link between *MALAT1* gene rs3200401-site and risk of renal cell carcinoma development (P > 0.05). No statistically significant results were found after adjustment for sex, body mass index, metastasis, smoking and drinking habits (P > 0.05). Conclusions. The rs3200401 gene polymorphism of long non-coding RNA *MALAT1* is not associated with the age of kidney cancer onset in Ukrainian population.