

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

DOI: 10.26693/jmbs05.01.308

УДК 616.6-006:577.213/.216

Волкогон А. Д.¹, Гарбузова В. Ю.², Атаман О. В.³

ЗВ'ЯЗОК ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВГОЇ НЕКОДУЮЧОЇ РНК *MALAT1* ІЗ МЕТАСТАЗУВАННЯМ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

¹ Медичний інститут Сумського державного університету,
кафедра хірургії та онкології, Україна

² Сумський державний університет,
Наукова лабораторія молекулярно-генетичних досліджень, Україна

³ Медичний інститут Сумського державного університету,
кафедра фізіології і патофізіології з курсом медичної біології, Україна

volkogon_andrei@ukr.net

У 2003 році днРНК *MALAT1* була виявлена як транскрипт, асоційований із метастазуванням у пацієнтів з ранньою стадією недрібноклітинного раку легенів. Сьогодні вважається, що основна функція *MALAT1* полягає у регуляції експресії генів, продукти яких причетні до утворення метастазів. Разом із цим на даний час існує незначна кількість публікацій щодо вивчення зв'язку однонуклеотидних поліморфізмів гена *MALAT1* із настанням онкопатологій різної локалізації, а також дослідження його асоціації із різними характеристиками та стадіями пухлинного процесу, включаючи метастазування.

Метою дослідження став пошук можливого зв'язку rs3200401-поліморфізму гена *MALAT1* із метастазуванням в українських пацієнтів із раком сечового міхура.

У роботі використана цільна венозна кров 141 пацієнта із перехідноклітинним раком сечового міхура (ПКРСМ). Генотипування за поліморфним сайтом rs3200401 гена *MALAT1* проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (Real-time PCR) із використанням 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, США) та Taq-Man Assays (TaqMan@SNP Assay C_3246069_10). Аналіз статистичних даних проводили за допомогою пакету програм SPSS (версія 17.0). Значення $P > 0.05$ вважали статистично достовірним.

Порівняльний аналіз розподілу генотипів за локусом rs3200401 гена *MALAT1* між хворими з та без метастазів показав відсутність достовірної різниці ($P = 0,074$), при цьому частоти алелів Т і С значущо відрізнялись між групами порівняння ($P = 0,015$). Поряд із цим було виявлено, що в носіїв мінорного Т-алеля з ПКРСМ ризик розвитку метастазів у 2,2 рази вищий, ніж в осіб із СС-генотипом ($P_{\text{спост}} = 0,048$; $OR_{\text{спост}} = 2,207$; 95% CI = 1,006-4,844). Проте після поправки на коваріації значущий зв'язок втрачався ($P_{\text{попр}} = 0,279$; $OR_{\text{попр}} = 0,678$; 95% CI = 0,335-1,371).

В українській популяції існує зв'язок поліморфізму rs3200401 гена *MALAT1* із розвитком метастазування у пацієнтів із ПКРСМ. Носії мінорного Т-алеля мають вищий ризик метастазуванням раку сечового міхура, порівняно із гомозиготами за основним С-алелем.

Ключові слова: довга некодуєча РНК, *MALAT1*, рак сечового міхура.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлена стаття є фрагментом НДР «Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб», № державної реєстрації 0110U005038.

Вступ. За останні роки у світовій науковій літературі з'явилась значна кількість повідомлень про різноманітні транскрипти, що не кодують

амінокислотні послідовності білків. На сьогодні встановлено, що майже 90 % геному людини активно транскрибується, при цьому лише 2 % становлять білок-кодуючі гени. Відповідно, більша частка транскриптів становить собою некодуючі РНК, які займаються регуляцією експресії більше 75 % генів людини [1].

Молекули некодуючих РНК залежно від їх розмірів поділяють на короткі (менше ніж 200 нуклеотидів) та довгі (більше ніж 200 нуклеотидів). У той час, як вже опубліковано чимало даних щодо впливу коротких варіантів цих молекул, особливо мікроРНК, на розвиток онкопатології шляхом інгібування експресії мРНК, вплив довгих некодуючих РНК (днРНК) наразі є менш вивченим та менш зрозумілим [2].

На сьогодні особливо увагу вчених багатьох лабораторій привертає днРНК *MALAT1* (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript), також відома як NEAT2 (noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2) [3]. Ген *MALAT1* уперше був ідентифікований у 2003 році у клітинах недрібноклітинного раку легень, де спостерігався надмірний рівень його експресії [4]. У даний час опубліковано низку праць стосовно асоціації зміни експресії *MALAT1* із виникненням різних видів онкологічних захворювань, включаючи рак молочної залози, рак ендометрію, рак шийки матки, гепатоклітинну карциному, рак печінки, рак сечового міхура, нейроblastому, остеосаркому, рак простати, рак підшлункової залози, рак шлунку та рак легень [5]. У клітинах карциноми нирки були зареєстровані рідкісні випадки хромосомних транслокацій за участю *MALAT1* [6]. Разом із цим особливий інтерес дослідників сьогодні привертає вивчення зв'язку однонуклеотидних поліморфізмів гена *MALAT1* із настанням онкопатологій різної локалізації, а також дослідження його асоціації із різними характеристиками та стадіями пухлинного процесу, включаючи метастазування.

Метою даного дослідження став пошук можливого зв'язку rs3200401-поліморфізму гена *MALAT1* із метастазування в українських пацієнтів із раком сечового міхура.

Матеріал та методи дослідження. У роботі була використана венозна кров 141 хворого із перехідноклітинним раком сечового міхура (ПКРСМ) (середній вік \pm SD) 67,60 \pm 12,12 роки). Усі пацієнти знаходились на лікуванні та/або спостереженні у Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері з 2005 по 2016 рік. Кінцевий морфологічний діагноз ПКРСМ встановлювався відповідно до рекомендацій Європейської асоціації урологів. Усі хворі мали II клінічну стадію раку відповідно до TNM-класифікації злоякісних пухлин, яку встанов-

лювали за результатами гістологічного дослідження або результатами МРТ. Із дослідної групи виключали осіб зі спадковими патологіями, хворобами нез'ясованої етіології та наявністю пухлин іншої локалізації.

Протокол дослідження був затверджений Етичним комітетом Медичного інституту Сумського державного університету (№3/05.12.11) та відповідав Гельсінській декларації. Усі учасники надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Для генотипування цільну венозну кров забирали у моновети об'ємом 2,7 мл із додаванням 11,7 мМ ЕДТА ("Sarstedt", Німеччина). ДНК із крові виділяли за допомогою комерційних наборів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Розподіл алелів за поліморфним сайтом rs3200401 гена *MALAT1* визначали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (Real-time PCR) із використанням 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, США) та Taq-Man Assays (TaqMan@SNP Assay C_3246069_10). Ампліфікація потрібної ділянки гена *MALAT1*, що містить поліморфний локус rs3200401, складалася із 50 циклів: початкова денатурація – 95°C (20 с), денатурація – 95°C (30 с) гібридизація та елонгація – 60,0°C (30 с). Аналіз даних, отриманих під час проведення полімеразної ланцюгової реакції, здійснювали із застосуванням програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software.

Аналіз статистичних даних проводили за допомогою пакету програм SPSS (версія 17.0). Перевірку відповідності розподілу алелів за rs3200401-локусом рівновазі Харді-Вайнберга та порівняння розподілу генотипів за досліджуванним локусом у різних групах проводили за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. З метою визначення ризику розвитку метастазування у хворих із ПКРСМ залежно від конкретного генотипу за rs3200401-сайтом за допомогою бінарної логістичної регресії розраховували відношення шансів (OR) та 95% довірчий інтервал (CI) в рамках різних моделей успадкування. З метою аналізу зв'язку rs3200401-локусу гена *MALAT1* із ризиком настання метастазування ПКРСМ в умовах поправки на вік, стать пацієнтів, наявність у них звички до паління та зловживання алкоголем застосовували мультиваріабельну логістичну регресію. Значення $P > 0.05$ вважали статистично достовірним.

Результати дослідження. У таблиці 1 представлена клінічна характеристика хворих на ПКРСМ окремо без та з метастазами. Показано, що групи порівняння не відрізнялись за показником віку ($P=0,631$), співвідношенням осіб різної статі

Таблиця 1 – Клінічна характеристики пацієнтів із ПКРСМ залежно від наявності метастазів

Параметр	Метастази (n = 68)	Немає метастазів (n = 73)	P
Вік, роки ± SD	68,74±11,67	66,53±12,51	0,631
Стать, ж/ч	14/54	13/60	0,675
Курці, n (%)	34 (50 %)	36 (49,3 %)	0,935
Алкоголь	42 (61,8 %)	58 (79,5 %)	0,021

Примітки: ПКРСМ – перехідноклітинний рак сечового міхура; n – кількість осіб; ж – жінки; ч – чоловіки; P – показник статистичної значущості. Категоріальні змінні порівнювались за допомогою χ^2 -тесту, кількісні змінні – за допомогою t-тесту.

(P=0,675) та кількістю курців (P=0,935). Поряд із цим кількість осіб, що зловживають алкоголем, була значущо вищою серед хворих без метастазів (P=0,021).

У результаті проведеного генотипування дослідних осіб за поліморфним сайтом rs3200401 гену *MALAT1* було отримано розподіл C- і T-алелів (C і T) та трьох різних варіантів генотипів: CC, CT і TT (табл. 2). Частоти алелів в обох групах відповідали рівновазі Харді-Вайнберга (P>0,05). Порівняльний аналіз розподілу генотипів за локусом rs3200401 гену *MALAT1* між хворими з та без метастазів показав відсутність достовірної різниці, проте показник P був близьким до рівня статистичної значущості (P=0,074). При цьому частоти алелів T і C значущо відрізнялись між групами порівняння (P=0,015).

Таблиця 2 – Розподіл алелів та генотипів за rs3200401-поліморфізмом гену *MALAT1* серед пацієнтів із ПКРСМ залежно від наявності метастазування

	3 метастазами (n = 68)		Без метастазів (n = 73)		P
	n	%	n	%	
Генотипи					
CC	46	67,6	60	82,2	0,074
CT	17	25,0	12	16,4	
TT	5	7,4	1	1,4	
Алелі					
C	109	80,1	132	90,4	0,015
T	27	19,9	14	9,6	

Примітки: ПКРСМ – перехідноклітинний рак сечового міхура; n – кількість осіб; P – показник статистичної значущості.

У таблиці 3 наведені результати регресійного аналізу з метою встановлення відносного ризику настання метастазування у пацієнтів із ПКРСМ залежно від конкретного генотипу за поліморфізмом rs3200401 гену *MALAT1*. Значущий зв'язок був

Таблиця 3 – Аналіз генотипної асоціації rs3200401-сайту гену *MALAT1* із ризиком розвитку метастазування у пацієнтів із ПКРСМ

Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95% CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95% CI)
Домінантна	0,048	2,207 (1,006-4,844)	0,279	0,678 (0,335-1,371)
Рецесивна	0,116	5,714 (0,650-50,22)	0,088	0,384 (0,374-2,653)
Наддомінантна	0,834	1,073 (0,552-2,086)	0,882	1,054 (0,526-2,111)

Примітки: ПКРСМ – перехідноклітинний рак сечового міхура; P_{спост} – спостережуване значення P без поправки на коваріати; OR_{спост} – спостережуване відношення шансів; P_{попр} – показник P після поправки на вік, стать, зловживання алкоголем та звичку палити; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати; 95% CI – 95% довірчий інтервал.

виявлений в рамках доміантної моделі (P_{спост} = 0,048). Було виявлено, що в носіїв мінорного T-алеля з ПКРСМ ризик розвитку метастазів у 2,2 рази вищий, ніж в осіб із CC-генотипом (OR_{спост} = 2,207; 95% CI = 1,006-4,844). Проте після поправки на вік, стать пацієнтів, наявність у них звички до паління та зловживання алкоголем статистично значущий зв'язок втрачався (P_{попр}=0,279; OR_{попр}=0,678; 95% CI=0,335-1,371).

Обговорення отриманих результатів. У 2003 році днРНК *MALAT1* була виявлена як транскрипт, асоційований із метастазуванням у пацієнтів з ранньою стадією недрібноклітинного раку легенів [3]. Сьогодні вважається, що основна функція *MALAT1* полягає у регуляції експресії генів, продукти яких причетні до утворення метастазів [7]. У роботі колективу Zhang et al. було показано, що експресія *MALAT1* корелює із розмірами пухлин у хворих на рак легенів, стадією та метастазами у регіонарні лімфовузли [8]. Разом із цим доведена її провідна роль у процесах альтернативного сплайсингу та епігенетичної модуляції генної експресії [9].

Ген днРНК *MALAT1* локалізований на 11-й хромосомі (11q13.1), складається із 8708 пар основ та містить 2 екзони [10]. На даний час відомо 5558 поліморфних сайтів гену *MALAT1*. Одним із найбільш досліджених щодо асоціації із виникненням онкологічних патологій є поліморфний локус rs3200401.

Колективом Wang et al. було показано, що у пацієнтів з раком легень, які були носіями T-алелю за поліморфізмом rs3200401 гену *MALAT1* середня тривалість життя була значущо більшою, ніж у гомозигот CC [11]. А групою Peng et al., показано, що жінки, які є CT-гетерозиготами за поліморфним локусом rs3200401 мають менший ризик настання раку молочної залози, якщо порівнювати із доміантними CC-гомозиготами [12].

Результати нашої роботи, навпаки, показали, що у пацієнтів із ПКРСМ мінорний Т-алель за поліморфізмом rs3200401 гену *MALAT1* значущо підвищує ризик розвитку метастазування. Проте, аналіз в умовах поправки на інші фактори ризику розвитку пухлинного процесу не показав достовірного зв'язку.

Висновки

1. В українській популяції існує зв'язок поліморфізму rs3200401 гену *MALAT1* із розвитком метастазування у пацієнтів із ПКРСМ.

2. Носії мінорного Т-алелю мають вищий ризик метастазування раку сечового міхура, порівняно із гомозиготами за основним С-алелем.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні ролі генетичного поліморфізму днРНК *MALAT1* у виникненні та розвитку метастазів у хворих із раком нирки та передміхурової залози.

References

1. Gibb A, Brown C, Lam W. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Carolyn Mol Cancer*. 2011; 10: 38. PMID: 21489289. PMCID: PMC3098824. doi: 10.1186/1476-4598-10-38
2. 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: 1322-31. PMID: 25600645. PMCID: PMC5884967. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2931
3. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics*. 2007. PMID: 17270048. PMCID: PMC1800850. doi: 10.1186/1471-2164-8-39
4. Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003; 22(39): 8031-41. PMID: 12970751. doi: 10.1038/sj.onc.1206928
5. Ma X, Wang J, Wang L, Ma C, Wang X, Liu F. 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. PMID: 26335021. PMCID: PMC4559210. doi: 10.1186/s12864-015-1881-x
6. Li M, Wang Y, Cheng L, Niu W, Zhao G. Long non-coding RNAs in renal cell carcinoma: A systematic review and clinical implications. *Oncotarget*. 2017; 8(29): 48424-35. doi: 10.18632/oncotarget.17053
7. Sun Y, Ma L. New Insights into Long Non-Coding RNA MALAT1 in Cancer and Metastasis. *Cancers*. 2019; 11(2): E216. PMID: 30781877. PMCID: PMC6406606. doi.org/10.3390/cancers11020216
8. 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): 2947-55. PMID: 25480417. doi: 10.1007/s13277-014-2925-6
9. Zhang X, Hamblin H, Yin KJ. The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions. *RNA Biol*. 2017; 14(12): 1705-14. PMID: 28837398. PMCID: PMC5731810. doi: 10.1080/15476286.2017.1358347
10. 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): 5017-28. PMID: 26205289. doi: 10.2174/1381612821666150724115625
11. Wang JZ, Xiang JJ, Wu GL, Bai YS, Chen ZW. 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. PMID: 28253859. PMCID: PMC5335789. doi: 10.1186/s12885-017-3151-6
12. Peng R, Luo C, Guo Q, Cao J, Yang Q, Dong K. Association analyses of genetic variants in long non-coding RNA MALAT1 with breast cancer susceptibility and mRNA expression of MALAT1 in Chinese Han population. *Gene*. 2018; 642: 241-8. PMID: 29146194. doi: 10.1016/j.gene.2017.11.013

УДК 616.6-006: 577.213 / .216

СВЯЗЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК *MALAT1* С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

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

Резюме. В 2003 году днРНК *MALAT1* была обнаружена как транскрипт, ассоциированный с метастазированием у пациентов с ранней стадией немелкоклеточного рака легких. Сегодня считается, что основная функция *MALAT1* заключается в регуляции экспрессии генов, продукты которых причастны к образованию метастазов. Вместе с тем в настоящее время существует незначительное количество публикаций по изучению связи однонуклеотидных полиморфизмов гена *MALAT1* с наступлением онкопатологий различной локализации, а также исследований его ассоциации с различными характеристиками и стадиями опухолевого процесса, включая метастазирование.

Целью исследования стал поиск возможной связи rs3200401-полиморфизма гена *MALAT1* с метастазированием у украинских пациентов с раком мочевого пузыря.

В работе использована цельная венозная кровь 141 пациента с переходноклеточным раком мочевого пузыря (ПКРМП). Генотипирование по полиморфному сайту rs3200401 гена *MALAT1* проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-time PCR) с использованием 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, США) и Taq-Man Assays (TaqMan@SNP Assay C_3246069_10). Анализ статистических данных проводили с помощью пакета программ SPSS (версия 17.0). Значение $P > 0.05$ считали статистически достоверным.

Сравнительный анализ распределения генотипов по локусу rs3200401 гена *MALAT1* между больными с и без метастазов показал отсутствие достоверной разницы ($P = 0,074$), при этом частоты аллелей Т и С значимо отличались между группами сравнения ($P = 0,015$). Наряду с этим было обнаружено, что у носителей минорного Т-аллеля с ПКРМП риск развития метастазов в 2,2 раза выше, чем у лиц с СС-генотипом ($P_{набл} = 0,048$; $OR_{набл} = 2,207$; 95% CI = 1,006-4,844). Однако после поправки на ковариаты достоверная связь терялась ($P_{попр} = 0,279$; $OR_{попр} = 0,678$; 95% CI = 0,335-1,371).

В украинской популяции существует связь полиморфизма rs3200401 гена *MALAT1* с развитием метастазирования у пациентов с ПКРМП. Носители минорного Т-аллеля имеют более высокий риск метастазирования рака мочевого пузыря по сравнению с гомозиготами по основной С-аллели.

Ключевые слова: длинная некодирующая РНК, MALAT1, рак мочевого пузыря.

UDC 616.6-006: 577.213 / .216

The Relation between Genetic Polymorphism of Long Non-Coding RNA *Malat1* and Bladder Cancer Metastasis

Volkogon A. D., Harbuzova V. Yu., Ataman A. V.

Abstract. Long non-coding RNA (lncRNA) *MALAT1* was firstly identified in 2003 as transcript associated with metastasis in patients with early-stage of non-small cell lung cancer. Today, it is believed that *MALAT1*'s primary function is the regulation of expression of genes which products are involved in metastases formation. However, there are currently few publications dealing with association of *MALAT1* gene single-nucleotide polymorphisms with the onset of oncological pathologies of different localization, and to investigating its association with various characteristics and stages of tumor process, including metastasis.

The purpose of the study was to find possible relation between *MALAT1* gene rs3200401 polymorphism and metastasis development in Ukrainian patients with bladder cancer.

Materials and methods. Whole venous blood of 141 patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder was used for study. Genotyping of *MALAT1* gene rs3200401 polymorphic site was performed by Real-time PCR using 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) and Taq-Man Assays (TaqMan@SNP Assay C_3246069_10). Statistical analysis was done using SPSS software package (version 17.0). Binary and multivariable logistic regression techniques were used to find the possible genotype association between *MALAT1* gene rs3200401 site and metastasis development. P values > 0.05 were considered to be statistically significant.

Results and discussion. The comparative analysis of *MALAT1* gene rs3200401 genotypes distribution between patients with and without metastases revealed no significant difference ($P = 0.074$), while T and C alleles frequencies significantly different between comparison groups ($P = 0.015$). In addition, it was found out that the risk of metastases development in minor T-allele carriers with transitional cell carcinoma of urinary bladder was 2.2 times higher compared with the individuals with CC-genotype ($P_{obs}=0.048$; $OR_{obs}=2.207$; 95% CI=1.006-4.844). However, after adjustment for age, gender, smoking habits and alcohol abuse the significant association was lost ($P_{adj}=0.279$; $OR_{adj}=0.678$; 95% CI=0.335-1.371).

Conclusion. The study results showed that there was a relation between *MALAT1* gene rs3200401 polymorphism and metastasis development in Ukrainian patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder. Minor T allele carriers have higher risk of bladder cancer metastasis onset compared to major C allele homozygotes.

Keywords: long noncoding RNA, MALAT1, bladder cancer.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 03.08.2019 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування