

УДК 577.2:616.006

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПАТОГЕНЕЗ ПОВЕРХНОСТНОГО И ИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

© 2011 г. А. Ю. Бабаян¹, О. Б. Карякин³, А. А. Теплов⁴, Д. В. Залетаев^{1,2}, М. В. Немцова^{1,2*}

¹Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

²Научно-исследовательский институт молекулярной медицины при Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова, Москва, 119991

³Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук, Обнинск, 249036

⁴Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, 125284

Поступила в редакцию 25.01.2011 г.

Принята к печати 21.02.2011 г.

Изучение делеций хромосомных локусов 3p14, 9p21, 9q34 и 17p13, активирующих мутаций в экзоне 7 гена *FGFR3* и аномального метилирования генов *RASSF1*, *RARβ*, *P16*, *P14* и *CDH1* выявило статистически значимое повышение частоты мутаций в гене *FGFR3* ($p = 0.004$) и делеций локуса 9p21 ($p = 0.006$) в малоинвазивных поверхностных опухолях мочевого пузыря (pT1) по сравнению с неинвазивными опухолями (pTa). Образцы поверхностных и инвазивных опухолей мочевого пузыря статистически значимо различались также по частоте делеций локусов 17p13 ($p = 0.006$) и 9q34 ($p = 0.04$), частоте гиперметилирования промотора гена *P16* ($p = 0.02$). Молекулярно-генетические различия в патогенезе инвазивного и поверхностного рака мочевого пузыря позволяют предположить существование двух независимых путей развития этих типов опухолей.

Ключевые слова: патогенез рака мочевого пузыря, поверхностный рак мочевого пузыря, инвазивный рак мочевого пузыря, активирующие мутации, делеции хромосомных локусов, аномальное метилирование.

SOME MOLECULAR-GENETIC MARKERS, DEFINING THE PATHOGENESIS OF SUPERFICIAL AND INVASIVE BLADDER CANCER, by A. Yu. Babayan¹, O. B. Karyakin³, A. A. Teplov⁴, D. V. Zaltaev^{1,2}, M. V. Nemtsova^{1, 2*} (¹Research Center for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia; ²Sechenov First Moscow Medical University, Moscow, 199991 Russia; *e-mail: nemtsova_m_v@mail.ru; ³Medical Radiology Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Kaluga Region, Obninsk, 249036 Russia; ⁴Moscow Herzen Oncological Research Institute, Moscow, 125284 Russia). We have investigated deletions of 3p14, 9p21, 9q34, 17p13 (TP53) loci, activating *FGFR3* mutations in exon 9 and aberrant methylation of *RASSF1*, *RARβ*, *P16*, *P14*, *CDH1* genes with the aim of the molecular pathogenesis pathways analysis of bladder cancer. *FGFR3* activating mutations and 9p21 deletions were observed significantly more frequent in the group of non-invasive bladder cancer pTa than in minimally-invasive cancers pT1 ($p = 0.004$ and 0.006 respectively). It was shown that groups of superficial and invasive bladder cancer are significantly differing in the frequency of 17p13 ($p = 0.006$) and 9q34 ($p = 0.04$) deletions and in aberrant methylation of the gene *P16* ($p = 0.02$). We have revealed some differing molecular-genetic alterations in groups of superficial and invasive bladder cancers. Therefore we suppose that these two types of bladder cancer might have different pathways of development.

Keywords: pathogenesis of bladder cancer, superficial bladder cancer, invasive bladder cancer, activating mutations, loci deletions, aberrant methylation.

Рак мочевого пузыря (РМП) — одно из наиболее тяжелых злокачественных новообразований, приводящее к инвалидизации и значительному ухудшению качества жизни больных. Ежегодно в

мире регистрируется более 300 тыс. новых случаев РМП, из них 13 тыс. — в России [1].

Опухоли МП условно можно разделить на две большие группы, различающиеся клиническим

Принятые сокращения: РМП — рак мочевого пузыря; ПРМП и ИРМП — поверхностный и инвазивный рак мочевого пузыря соответственно; МП — мочевой пузырь.

* Эл. почта: nemtsova_m_v@mail.ru

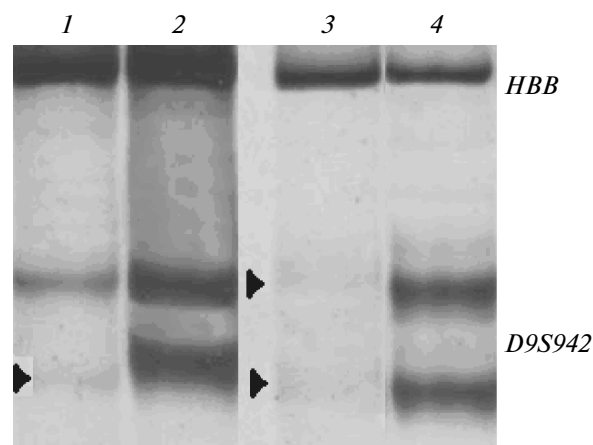
поведением, злокачественным и метастатическим потенциалом. К группе поверхностного РМП (ПРМП) относят опухоли, ограниченные слизистым и подслизистым слоем (pTа-pT1) МП. ПРМП составляет до 80% первичного РМП и, хотя для опухолей этого типа характерна повышенная частота рецидивирования, клинически ПРМП имеет более благоприятное течение по сравнению с опухолями второй группы [2], к которой относят инвазивный рак мочевого пузыря (ИРМП), прорастающий в мышечный слой и далее (pT2-4). ИРМП характеризуется агрессивным течением и низкой выживаемостью больных, поэтому для хирургического лечения опухолей этого типа применяют цистэктомия. В 25% случаев ПРМП приобретает инвазивные свойства и переходит во вторую группу [3]. В настоящее время нет однозначного мнения, возникают ли инвазивные опухоли в результате прогрессии неинвазивных, или их развитие происходит независимыми путями [4]. Выявление основных молекулярно-генетических различий в патогенезе инвазивного и неинвазивного РМП — важная задача молекулярной онкологии. Определение этих различий лабораторными методами позволит использовать их в качестве системы молекулярных маркеров с целью раннего выявления агрессивного характера опухоли и выбора адекватной тактики хирургического вмешательства.

В процессе превращения нормальной клетки в злокачественную в ее геноме накапливаются различные повреждения, приводящие к активации протоонкогенов и инактивации генов-супрессоров, контролирующих клеточный цикл [5]. Каждый тип опухолей имеет свой собственный профиль геномных повреждений, который характеризует этапы трансформации и молекулярный патогенез опухоли, а также определяет особенности заболевания и его прогноз.

С целью изучения молекулярного патогенеза ПРМП и ИРМП, а также создания прогностической системы, сравнили частоты следующих повреждений в геноме опухолевых и нормальных тканей: делеций хромосомных локусов 3p14, 9p21, 9q34, 17p13), активирующих мутаций в экзоне 7 гена *FGFR3* и аномального метилирования генов *RASSF1*, *RARβ*, *P16*, *P14* и *CDH1*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коллекцию из 108 парных образцов опухоль/периферическая кровь больных с установленным диагнозом ПРМП и 14 парных образцов с диагнозом ИРМП. Материал получен от больных, наблюдавшихся в Отделении лучевого и хирургического лечения урологических заболеваний Медицинского радиологического научного центра РАМН (г. Обнинск) и в Отделении онкоурологии Московского научно-



Определение аллельных делеций локуса 9p21 (D9S942) в парах образцов нормальных тканей (2 и 4) и опухолей (1 и 3) мочевого пузыря с использованием ПЦР. HBB — продукт ПЦР контрольного гена. Стрелками указаны аллели. 1 — Гемизиготная делеция, 3 — гомозиготная делеция.

исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена.

Медиана возраста больных — 58.5 ± 11.5 года (26–75 лет); соотношение мужчины/женщины — 6/1.

Коллекция содержала 24 неинвазивных опухоли (pTа), 84 опухоли с минимальной инвазией (pT1), а также 14 образцов инвазивных опухолей (pT2-4). Инвазивность определяли на основании заключений двух морфологов.

Геномную ДНК из ткани опухоли и лимфоцитов периферической крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [6].

Метилирование CpG-островков анализировали методом метил-чувствительной ПЦР [7].

Делеции хромосомных локусов анализировали на парных образцах ДНК из опухоли и лимфоцитов периферической крови с использованием STR-маркеров: D9S942, D9S169 и D9S2136 (9p21), D3S1234 и D3S1300 (3p14 — локус гена *FHIT*), D9S313 (9q34 — локус гена *LAMC3*), D17S1353 и IVS1 (17p13 — локус гена *TP53*). Делеции локуса 9p21 анализировали с помощью многолокусной ПЦР STR-маркеров с контрольным фрагментом *HBB* (11p15) (условия ПЦР и нуклеотидные последовательности праймеров приведены на сайте <http://www.genome.ucsc.edu>). Наличие делеций определяли по значительному уменьшению количества (или полному отсутствию) одного или обоих фрагментов микросателлитного повтора по сравнению с контрольным фрагментом (рисунок).

Мутации в экзоне 7 гена *FGFR3* определяли методами SSCP-анализа и прямого секвенирования [8].

Сравнение частот молекулярно-генетических изменений в группах больных поверхностным (ПРМП) и инвазивным (ИРМП) раком мочевого пузыря

Группа опухолей	Структурная патология					Эпигенетическая патология (аномальное метилирование)				
	делеции				мутации	<i>RASSF</i>	<i>RARβ</i>	<i>P16</i>	<i>P14</i>	<i>CDH1</i>
	17p13	3p14	9q34	9p21						
рТа 24	1/22	2/14	2/13	10/23	9/24	6/24	7/24	5/24	1/24	8/24
рТ1 84	9/69	11/45	10/45	11/78	9/84	23/84	18/84	8/84	7/84	15/84
<i>p</i>	—	—	—	0.006	0.004	—	—	—	—	—
ПРМП 108	10/91	13/59	12/58	21/101	18/108	29/108	25/108	13/108	8/108	23/108
ИРМП 14	7/14	0/12	7/14	2/10	0/14	7/14	7/14	5/14	1/14	5/14
<i>p</i>	0.006	—	0.04	—	—	—	—	0.02	—	—

Примечание. В ячейках с численными значениями указано соотношение числа определенных изменений и числа информативных случаев в группе.

рТа – Неинвазивные опухоли мочевого пузыря, рТ1 – опухоли с минимальной инвазией в подслизистый слой.

Статистический анализ результатов включал сравнение клинических групп с помощью двустороннего точного критерия Фишера (уровень значимости $\alpha = 0.05$), вычисление показателя отношения вероятностей (*OR*) и соответствующих 95% доверительных интервалов (95% CI) при помощи программы STATISTICA v. 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В представленной работе мы определяли частоты молекулярно-генетических повреждений в образцах ПРМП и ИРМП. Результаты этого анализа приведены в таблице.

Мы проанализировали 122 образца РМП и в 90 из них (73.0%) обнаружили хотя бы одно из изменений в ДНК, выделенной из опухолевой ткани. В 32 образцах (27.0%) не выявлено никаких молекулярно-генетических изменений. Только структурные повреждения, к которым относятся мутации и аллельные делеции, найдены в 25 образцах из 122 (20.5%), а гиперметилирование промоторных участков генов в отсутствие структурных изменений – в 32 (26.2%).

Частота наиболее распространенной при ПРМП структурной патологии – делеции локуса 3p14 – составила 22%, а наиболее редкой – делеции локуса TP53 – 11.0%. Наиболее частое эпигенетическое изменение – метилирование гена *RASSF1*, выявлено в 27.4% образцов, а наиболее редкое – гиперметилирование гена *P14* – в 8.8%. Кроме того, неинвазивные (рТа) и минимально инвазивные (рТ1) ПРМП статистически значимо различались по частоте мутаций в гене *FGFR3* ($p = 0.004$), а также делеций локуса 9p21 ($p = 0.006$).

В ИРМП преобладали делеции локусов TP53 и 9q, представленные с одинаково высокой частотой (50%), тогда как мутации гена *FGFR3* и делеции локуса 3p14 не были обнаружены (0%). Гипо-

метилирование генов *RASSF1* и *RARβ* встречалось с одинаково высокой частотой (50%), а наиболее редким эпигенетическим событием в этой группе РМП оказалось метилирование гена *P14* (11.1%).

Нами показано, что поверхностные и инвазивные опухоли МП статистически значимо различаются по частоте делеции локуса 17p13 ($p = 0.006$), 9q34 ($p = 0.04$) и гиперметилирования гена *P16* ($p = 0.02$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным нами данным, в группе ПРМП неинвазивные (рТа) и минимально инвазивные (рТ1) опухоли статистически значимо различаются по частоте мутации в гене *FGFR3* ($p = 0.004$). Таким образом, мутации в гене *FGFR3* ассоциированы с более благоприятным течением заболевания. Подобное заключение подтверждается тем, что нам не удалось найти мутации в гене *FGFR3* в группе ИРМП, хотя отсутствие достоверных различий может объясняться небольшим размером выборки.

В настоящее время считается, что одно из начальных событий, приводящих к развитию РМП, – делеция хромосомы 9. Выделяют четыре основных локуса, делеции которых критичны для развития РМП: 9p21, 9q22, 9q32-33, 9q34 [2, 9]. Частота этих делеций при ПРМП и ИРМП примерно одинакова [10].

Нами показано достоверное увеличение частоты делеций 9p21 в минимально инвазивных опухолях (рТ1) по сравнению с инвазивными (рТа) ($p = 0.006$). Большая часть делеций, выявленных в этой группе (шесть из десяти), гомозиготна. Ранее мы установили, что делеции этого локуса связаны с повышенной частотой рецидивирования, характерной для ПРМП [11]. Таким образом, активирующие мутации в гене *FGFR3* и делеции ло-

куса 9p21 гораздо чаще возникают в неинвазивных опухолях и могут рассматриваться как маркеры более благоприятного прогноза.

Показано, что группы ПРМП и ИРМП статистически значимо различаются по частоте делеций локуса 17p13 ($p = 0.006$), 9q34 ($p = 0.04$) и гиперметилирования гена *P16* ($p = 0.02$). Существование корреляции между делециями локуса 17p13 и неблагоприятным прогнозом развития опухоли обнаружено ранее [4, 7].

В настоящее время предполагается, что повреждение генов *FGFR3* и *TP53* могут определять дальнейший путь развития РМП [12, 13]. Известно, что мутации в гене *FGFR3* характерны для гиперплазии с последующим переходом в папиллярный неинвазивный РМП. В то же время, если на стадии гиперплазии или дисплазии возникает повреждение гена *TP53*, то происходит трансформация клетки в карциному *in situ* (CIS) и в дальнейшем развивается инвазивный рак [12, 14].

Исследования, выполненные на трансгенных мышах, подтверждают существование независимых молекулярно-генетических механизмов, ведущих к развитию двух основных типов РМП [15, 16]. При этом инактивация p53 вызывает развитие CIS, а для ее прогрессии в инвазивную форму необходима инактивация белка Rb1 [17].

На инвазивность опухолевых клеток влияют не только генетические изменения, но и эпигенетические процессы, например дисбаланс метилирования [17–19].

Нами обнаружено статистически значимое повышение частоты аномального метилирования гена *P16* (*CDKN2A*) ($p = 0.02$) в ИРМП по сравнению с ПРМП. Статистически значимые ассоциации инвазивности с аномальным метилированием других генов (*RASSF1*, *P14ARF*, *RARβ* и *CDH1*) не выявлены, однако суммарная частота эпигенетических изменений в ИРМП значительно выше, что согласуется с результатами других работ [20]. Возможно, путь развития ИРМП предполагает повышение частоты эпигенетических событий в геноме опухолевых клеток.

Определение частоты аллельных делеций локуса 9q34.13 показало, что ген *LAMC3*, расположенный в этом локусе, делетирован в 50% образцов ИРМП и в 20.6% ПРМП ($p = 0.04$). Все это подтверждает данные о существовании значимой связи между делециями локуса 9q34.13 и инвазивным течением РМП [21].

Полученные нами данные позволяют предположить, что одно из наиболее ранних событий, происходящих в процессе злокачественной трансформации нормального уротелия, — изменения в локусе 9p21. Частота структурной и эпигенетической патологии в этом локусе, считая делеции и аномальное метилирование генов *p16* и *p14*, со-

ставляет 41% (50/122), следовательно, она максимальна среди генов, проанализированных нами.

Результаты нашей работы и опубликованные данные позволяют предложить следующую модель развития РМП. Наиболее раннее событие в процессе злокачественной трансформации нормального уротелия — потеря хромосомного материала локуса 9p21. Делеция этого локуса не влияет на инвазивные свойства опухоли. Далее возможны два независимых пути развития РМП. Преимущественная активации протоонкогенов, таких как *FGFR3*, *H-Ras*, приведет к развитию ПРМП. Если в клетках нормального уротелия или в клетках ПРМП произойдет накопление повреждений и инактивация основных генов-супрессоров (*TP53*, *PTEN*, *RBI*), а также ламинина, обеспечивающего прикрепление клеток эпителия к базальной мембране, то это приведет к развитию потенциально более агрессивного ИРМП.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00216-а) и Государственного контракта Министерства науки и образования Российской Федерации (№ 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. 2008. *Злокачественные новообразования в России в 2006 году (Заболеваемость и смертность)*. М.: ФГУ “МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий”.
2. Pasin E., Josephson D.Y., Mitra A.P., Cote R.J., Stein J.P. 2008. Superficial bladder cancer: An update on etiology, molecular development, classification and natural history. *Rev. Urology*. **10**, 31–43.
3. Карякин О.Б., Башкатов С.В., Немцова М.В. 2006. Клиническое значение молекулярно-генетических изменений в клетках уротелия при раке мочевого пузыря. *Онкоурология*. **3**, 54–58.
4. Knowles M.A. 2006. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. **27**, 361–373.
5. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В., и др. 2004. Диагностика эпигенетической патологии при наследственных и онкологических заболеваниях. *Молекуляр. биология*, **38**(2), 213–223.
6. Costello J., Plass C. 2001. Methylation matters. *J. Med. Genet.* **38**, 285–303.
7. Немцова М.В., Михайленко Д.С., Кекеева Т.В., и др. 2007. Молекулярно-генетические маркеры в онкоурологии. *Молекуляр. медицина*. **3**, 43–54.
8. Tomlinson D.C., Baldo O., Harnden P., Knowles M.A. 2007. *FGFR3* protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J. Pathol.* **213**, 91–98.
9. Simoneau M., LaRue H., Aboukassim T.O., Meyer F., Moore L., Fradet Y. 2000. Chromosome 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer: identification of four regions of prognostic interest. *Oncogene*. **19**, 6317–6323.

10. Cairns P., Shaw M.E., Knowles M.A. 1993. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumor-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene*. **8**, 1083–1085.
11. Бабаян А.Ю., Башкатов С.В., Карякин О.Б. и др. 2009. Молекулярно-генетические маркеры как факторы прогноза течения поверхностного рака мочевого пузыря. *Онкоурология*. **3**, 19–24.
12. Castillo-Martin M., Domingo-Domenech J., Karni-Schmidt O., Matos T., Cordon-Cardo C. 2010. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol. Oncol.* **28**, 401–408.
13. Wu X.R. 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathway. *Nat. Rev.* **5**, 713–725.
14. Cordon-Cardo C. 2008. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* **218**, 154–165.
15. Mo L., Zheng X., Huang H.Y., Shapiro E., Lepor H., Cordon-Cardo C., Sun T.T., Wu X.R. 2007. Hyperactivation of *Ha-ras* oncogene, but not *Ink4a/Arf* deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **117**, 314–325.
16. Zhang Z.T., Pak J., Shapiro E., Sun T.T., Wu X.R. 1999. Urothelium-specific expression of an oncogene in transgenic mice induced the formation of carcinoma *in situ* and invasive transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* **59**, 3512–3517.
17. Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., Issa J.P. 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **72**, 141–196.
18. Jones P.A., Leard P. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* **21**, 163–167.
19. Maruyama R., Toyooka S., Toyooka K.O., et al. 2001. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* **61**, 8659–8663.
20. Wolff E.M., Chihara Y., Pan F., Weisenberger D.J., Siegmund K.D., Laird P.W., Jones P.A., Liang G. 2010. Unique DNA methylation patterns distinguish superficial and invasive bladder cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res.* Published Online First September 14, 2010; doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1335.
21. Hirao S., Hirao T., Marsit C.J., Hirao Y., Schned A., Devi-Ashok T., Nelson H.H., Andrew A., Karagas M.R., Kelsey K.T. 2005. Loss of heterozygosity on chromosome 9q and p53 alterations in human bladder cancer. *Cancer.* **104**, 1918–1923.