

Е.И. Якубович, А.Г. Полищук, В.И. Евтушенко

Взаимосвязь между инактивацией экспрессии гена DUSP9 и гиперметилированием его промотора у пациентов с почечно-клеточной карциномой

ФГБУ «РНЦРХ им. акад. А.М. Гранова», Санкт-Петербург

DUSP9 / MKP-4 относится к группе биспецифических протеин-фосфатаз, которые путем дефосфорилирования MAP-киназ (ERK1/2, p38 и JNK) негативным образом регулируют активность MAP-киназных каскадов. Активация MAP-киназных каскадов характерна для разных типов опухолей, включая рак почки. Ранее нами было обнаружено снижение уровня мРНК DUSP9 в опухолях пациентов со светлоклеточной карциномой почки (СКК). В данной работе мы, используя метод полуквантитативной полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), оценили уровень экспрессии DUSP9 у пациентов с почечно-клеточной карциномой (ПКК) трех гистологических вариантов: СКК (26 образцов), папиллярный (2 образца) и хромофобный (1 образец). Для каждого пациента были проанализированы по три локально удаленных друг от друга фрагмента опухоли. Во всех фрагментах у всех пациентов выявлено подавление экспрессии DUSP9 по сравнению с нормальной тканью, что свидетельствует о том, что инактивация гена DUSP9 является ранним событием канцерогенеза почки. Одним из механизмов инактивации генов в опухолевой клетке может быть метилирование ДНК в области промотора. На клеточных линиях опухоли почки установлено, что деметилирующий агент 5-Aza-дезоксцитидин активирует транскрипцию гена DUSP9 в клетках, что коррелирует с уменьшением уровня метилирования его промотора. Мы оценили уровень метилирования промоторного участка DUSP9 в 31 образце ПКК (11 женщин и 20 мужчин) и показали, что гиперметилирование в опухоли зависит от пола пациента. Гиперметилирование промотора DUSP9 выявлено в опухолях 10 из 11 женщин. У мужчин метилированные аллели DUSP9 не были обнаружены ни в опухолях, ни в парных нормальных образцах. Результаты нашего исследования показывают, что экспрессия гена DUSP9 может регулироваться эпигенетически, однако отсутствие

взаимосвязи между уровнем метилирования промотора DUSP9 и его экспрессией у мужчин указывает на то, что существуют иные механизмы инактивации гена DUSP9 в опухоли почки.

Ключевые слова: почечно-клеточная карцинома, опухолевый супрессор, DUSP9 / MKP-4, метилирование ДНК

Введение

Рак почки по частоте встречаемости среди основных онкологических заболеваний занимает 12 место и его доля составляет 2,4% [3]. Наиболее распространенным вариантом опухолей почки является почечно-клеточная карцинома (ПКК), которая выявляется в 80-90% случаев. Основными гистологическими вариантами ПКК являются светлоклеточная карцинома (70-80%), папиллярная (15%) и хромофобная (4-5%). Оптимальным методом лечения локализованного рака почки является хирургический. Длительное бессимптомное течение заболевания и отсутствие методов раннего выявления приводит к тому, что у более трети пациентов с первичным диагнозом ПКК уже имеются метастазы. Лечение метастатических опухолей почки представляет большую проблему, так как они устойчивы к химиопрепаратам и облучению. Результаты молекулярно-биологических исследований способствовали внедрению в клиническую практику для лечения пациентов с распространенным раком почки таргетных препаратов. Однако высокая частота развития устойчивости к современным таргетным препаратам уже в течение первого года является ограничением в достижении эффективности лечения. Одной из причин низкой эффективности терапии является внутриопухолевая гетерогенность. Разветвленный путь клональной эволюции опухоли, который характерен и для рака почки, приводит к тому, что в пределах одной опухоли сосуществуют различные локально разделенные субклоны, отличающиеся на генетическом, эпигенетическом, транскриптомном и протеомном уровнях [4].

Одним из перспективных подходов для лечения гетерогенных опухолей является воздействие на ранние «драйверные» молекулярные изменения, которые присутствуют во всех опухолевых клетках [15].

МАР-киназы контролируют основные клеточные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток. Аберрантная активность МАР-киназ (МАРК) характерна для опухолей разного происхождения [2]. Ключевыми негативными регуляторами МАРК являются МАРК- фосфатазы (МКР), которые относятся к семейству биспецифических протеинфосфатаз, способных дефосфорилировать белки как по тирозиновым, так и по серин/треониновым остаткам. У млекопитающих описано 10 различных МКР, которые отличаются по субстратной специфичности, уровню экспрессии в разных тканях и внутриклеточной локализации. Имеющиеся клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что МКР могут играть значимую роль в канцерогенезе [8].

Ген DUSP9 кодирует протеинфосфатазу МКР-4, преимущественным субстратом которой является ERK1/2 [9]. Ген локализован в локусе Xq28 и имеет тканеспецифичный характер экспрессии: активно транскрибируется в нормальной ткани почки, плаценте и эмбриональной печени [9]. Имеющиеся данные, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, указывают на то, что DUSP9 может выполнять функцию опухолевого супрессора [7, 9]. В клинических исследованиях подавление экспрессии DUSP9 выявлено в опухолях пациентов с гепатоклеточной карциномой и карциномой желудка [7, 12]. Ранее, используя метод кДНК-эРрей гибридизации, мы выявили подавление экспрессии гена DUSP9 в опухолевой ткани пациентов со светлоклеточной карциномой [1]. Позднее наши результаты были подтверждены в работе [13]. Механизмы инактивации гена DUSP9 при раке почки пока не изучены. Одним из возможных механизмов инактивации генов супрессоров в опухолях может быть гиперметилирование промоторных CpG-островков.

В настоящем исследовании мы попытались определить, существует ли связь между уровнем метилирования промоторного участка DUSP9 и его транскрипционной активностью при ПКК.

Материалы и методы

Клинический материал. Парные образцы опухоли почки и прилежащей к ней условно нормальной ткани были получены от 34 пациентов с ПКК, оперированных в ФГБУ «РНЦ РХТ им. ак. А.М. Гранова» (г. Санкт-Петербург). Все образцы прошли патоморфологическое исследование. Все пациенты, включенные в исследование, подписали форму

информированного согласия, одобренную этическим комитетом учреждения.

Клеточные культуры. Клеточные линии карциномы почки 769-P и ТК-10 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS, 1 mM пирувата натрия, 1 mM L-глутамин, 10 mM HEPES, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все реагенты Sigma-Aldrich).

Обработка клеток 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC; Sigma). Клетки в логарифмической фазе роста обрабатывали 5-Aza-dC в концентрации 1 мкМ или 5 мкМ в течение 48, 72 и 96 часов, после чего клетки собирались для экстракции ДНК и РНК.

Выделение нуклеиновых кислот. Геномную ДНК из тканей и клеток выделяли стандартным методом фенол-хлороформной очистки. Для выделения РНК использовали гуанидинтиоционатный метод с кислородофенольной экстракцией.

Полуколичественная ОТ-ПЦР. Синтез кДНК проводили с использованием случайных праймеров и набора для синтеза кДНК RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Для нормирования в качестве внутреннего контроля использовали бета-actin. Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Реакционная смесь содержала 1 мкл кДНК, 2,5 мкл 10x буфера для Taq полимеразы, 400 нМ каждого праймера, 200 мкМ каждого dNTP, 1,5 mM MgCl₂ и 0,25 ед. Taq полимеразы (Litech, Moscow, Russia). Амплификация фрагмента гена DUSP9 проводилась в присутствии 5% (по объему) DMSO. Условия реакции: для бета-актина: 95°C, 1 мин; затем 25 циклов - 94°C, 30 сек; 64°C, 1 мин; 72°C, 2 мин. Заключительный цикл - 72°C 8 мин. Для DUSP9: 95°C, 3 мин; затем 35 циклов - 94°C, 1 мин; 60°C, 50 сек; 72°C, 2 мин. Заключительный цикл - 72°C 8 мин.

Анализ метилирования. Уровень метилирования ДНК оценивали методом COBRA [14]. Бисульфитную модификацию проводили с использованием набора methylSEQR™ (Applied Biosystems), следуя рекомендациям производителя. Праймеры, фланкирующие промоторный фрагмент гена DUSP9 длиной 315 п.о., были подобраны с использованием программы Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems) (табл. 1). Амплификацию модифицированной ДНК проводили в 2 раунда. В 1 раунде использовали праймеры F и R. Реакционная смесь общим объемом 50 мкл содержала 2 мкл модифицированной ДНК, 5 мкл 10x буфера для Taq полимеразы, 400 нМ каждого праймера, 200 мкМ каждого dNTP, 1,5 mM MgCl₂ и 0,5 ед. Taq полимеразы (Litech, Moscow, Russia). Условия реакции: 95°C, 4 мин; затем 25 циклов - 94°C, 30 сек; 60°C 50 сек; 72°C 2 мин. Заключительный цикл - 72°C, 4 мин. 2 раунд проводили в тех же условиях, используя 1 мкл амплифицированного в 1 раунде продукта и праймеры F_n и R. Амплифицированный продукт 315 п.о. очищали из легкоплавкой агарозы и гидролизовали рестриктазой Bsh1236I (BstUI) (Thermo Fisher Scientific). Продукты гидролиза фракционировали в 6% полиакриламидном геле и после окрашивания SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) гель сканировали, используя систему ImageQuant™ LAS4000 molecular imager (GE Healthcare, Sweden). Уровень метилирования количественно оценивали по программе ImageQuant TL 7.0 software (GE Healthcare).

Для анализа метилирования методом секвенирования, очищенные ампликоны клонировали в вектор pTZ57R/T, используя набор InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) и по семь клонов для каждого ампликона секвенировали, используя M13 forward праймер и набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Уровень метилирования оценивали

Таблица 1. Последовательности использованных праймеров

DUSP9	Для ОТ-ПЦР	F: 5' - GCGTTAGGCTGCAGCAGTG - 3' R: 5' - GTAGCCTTCTCTCGCAGCTTCTG - 3'
	Для COBRA	F: 5' - GTTGGGGTGTAGTGTAGATTTT - 3' R: 5' - AAAACGCCACTACTACAACCTA - 3' Fn: 5' - AGAGAATAGAGGTTTGTAGGTGG - 3'
Beta-actin		F: 5' - CCTCGCCTTTGCCGATCC - 3' R: 5' - GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC - 3'

как долю метилированных CpG-сайтов среди всех проанализированных.

Аннотация гена. Все данные о нуклеотидной последовательности гена и аннотации были получены из базы данных UCSC Genome Browser Database (<http://genome.ucsc.edu>).

Результаты

В исследование были включены пациенты с ПКК, перенесшие нефрэктомия. Опухоли пациентов были разных гистологических типов и клинических стадий (табл. 2). Мы сравнили уровень мРНК гена DUSP9 в опухоли и прилегающей морфологически не измененной ткани почки. У каждого пациента анализировались 3 пространственно разделенных фрагмента опухолевой ткани. У 28 из 29, включенных в исследование пациентов, уровень мРНК DUSP9 был значительно снижен во всех трех фрагментах опухоли по сравнению с нормальной тканью, не зависимо от стадии заболевания (рис. 1). Этот результат указывает на то, что подавление транскрипции DUSP9 происходит на ранней стадии канцерогенеза почки.

Метилирование цитозинов в кластерах 5'-CpG-3'-динуклеотидов, называемых CpG-островками, является одним из механизмов

эпигенетической регуляции экспрессии генов. Чаще всего CpG островки локализируются в области промотора и первого экзона генов. Гиперметилирование CpG островков обычно подавляет экспрессию, и, наоборот, гипометилирование активирует экспрессию гена. Согласно геномной базе данных UCSC в последовательности гена DUSP9 локализовано несколько CpG островков, один из которых расположен рядом с сайтом инициации транскрипции, остальные находятся внутри гена. Чтобы понять, влияет ли метилирование ДНК на транскрипционную активность DUSP9, мы обработали клетки карциномы почки клеточных линий 769-P и TK10 ДНК-деметирующим агентом 5-Aza dC, а затем сравнили уровни метилирования участка промоторного CpG островка в обработанных и необработанных клетках. Анализ метилирования проводили методом COBRA. Из клеток выделяли геномную ДНК, и, после ее модификации бисульфитом натрия, амплифицировали фрагмент CpG островка размером 315 п.о. (F315, рис. 2А). Затем амплифицированный фрагмент гидролизовали рестрикционной эндонуклеазой BstU I. В F315 фрагменте присутствуют два сайта узнавания BstU I, каждый из которых охватывает два CpG (на рис. 2А позиции -136/-134 и -114/-112). Расщепление F315 фрагмента BstU I

Таблица 2. Клиническая и молекулярная информация о пациентах с почечно-клеточной карциномой

Гистологический вариант карциномы	Стадия	Пол пациента	№ пациента	Уровень DUSP9 мРНК в опухолях в сравнении с нормальной тканью
Светлоклеточная	T1N0M0	Ж	1, 2, 3	
		М	4	
	T2N0M0	Ж	6-11	
			12, 13	н/о
		М	14-25	
	T2N1M0	Ж	26-28	н/о
			29	
T3N0M0	М	30	-	
Папиллярная	T2N0M0	Ж	31	
	T3N1M0	М	32, 33	
Хромофобная	T2N0M0	Ж	34	

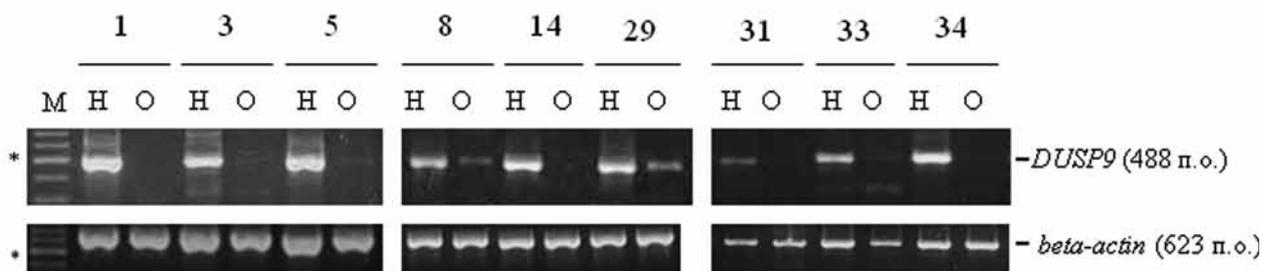


Рис. 1. Снижение уровня транскрипции DUSP9 в опухолях пациентов с ПКК. О – опухолевая ткань, Н – прилежащая условно нормальная ткань почки. М – молекулярный маркер 100 bp GeneRuler (Thermo Fisher Scientific). * - положение фрагмента размером 500 п.о. Номер пациента указан в соответствии с табл. 2.

рестриктазой происходит только в том случае, если оба цитозина внутри сайта распознавания метилированы в исходной последовательности. Как видно на рис. 2Б, в обеих клеточных линиях доля нерасщепленного F315 увеличивается после обработки клеток 5-Аза dC, что указывает на снижение уровней метилирования исследуемого участка геномной ДНК в обработанных клетках. Для детального анализа метилирования F315-фрагмента проводилось его бисульфитное секвенирование. F315, полученные из каждой клеточной линии до и после воздействия 5-Аза dC, клонировали в вектор pTZ57R/T и по семь клонов для каждого ампликона секвенировали. В обеих клеточных линиях было обнаружено снижение уровня метилирования исследуемого локуса после воздействия 5-Аза dC: в 769-Р клетках с 70% до 41% и в клетках ТК-10 с 91% до 84%. Таким образом, оба метода показали, что 5-Аза dC снижает уровень метилирования промоторной области гена DUSP9. Деметилирование промоторной области гена DUSP9 коррелирует с увеличением уровня его транскрипции в опухолевых клетках, обработанных 5-Аза dC (рис. 3). Таким образом, результаты анализа показывают, что гиперметилирование промотора может быть одним из механизмов транскрипционной инактивации DUSP9 в ПКК.

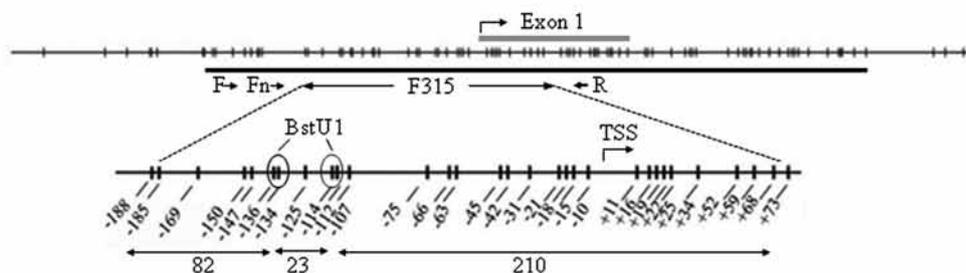
Чтобы оценить роль метилирования промотора DUSP9 в подавлении транскрипционной активности гена в клинических образцах ПКК, мы проанализировали статус метилирования F315 в 31 парных образцах (ПКК/прилежащая нормальная ткань) методом COBRA (рис. 4). Анализ показал, что уровень метилирования DUSP9 выше в опухоли по сравнению с нормальной тканью у 10 из 11 женщин (91%), тогда как у мужчин (20 пациентов) метилированные аллели не были обнаружены ни в опухоли, ни в нормальной ткани. Бисульфитное секвенирование F315, полученного из образца ДНК одной женщины и одного мужчины подтвердило ре-

зультаты, полученные методом COBRA. В опухолевой ткани женщины 85% CpG динуклеотидов в F315 были метилированы, в то время как в нормальной прилежащей ткани только 18%. В образцах опухоли и нормальной ткани мужчины метилированные CpG-сайты не обнаружены. Эти данные указывают на то, что в подавлении гена DUSP9 при ПКК участвуют и другие, пока не выясненные факторы.

Обсуждение

В настоящем исследовании мы показали, что у пациентов с ПКК различных гистологических вариантов уровень экспрессии гена DUSP9, кодирующего биспецифическую протеинфосфатазу, значительно снижен в опухолевой ткани по сравнению с прилегающей условно нормальной тканью. Наши результаты согласуются с опубликованными ранее исследованиями, в которых было продемонстрировано снижение экспрессии DUSP9 в клинических образцах светлоклеточного рака почки [13, 16]. Большая часть исследованных опухолевых образцов в нашей работе представлена самым распространенным светлоклеточным вариантом карциномы почки. К сожалению, другие морфологические варианты ПКК ограничены 4 образцами, и для оценки участия DUSP9 в развитии этих гистологических подтипов требуется исследование на расширенной выборке. Тем не менее, мы показали, что у всех пациентов, независимо от стадии заболевания и гистологического варианта опухоли, уровень мРНК гена DUSP9 снижен в трех дистанционно-отдаленных фрагментах опухоли. Этот результат свидетельствует о том, что подавление транскрипции гена DUSP9 может быть одним из ранних событий в канцерогенезе почки. Данное предположение согласуется с результатами исследования Liu et al., которые показали, что уменьшение экспрессии DUSP9 инициирует трансформацию кератиноцитов мыши в опухо-

А



Б

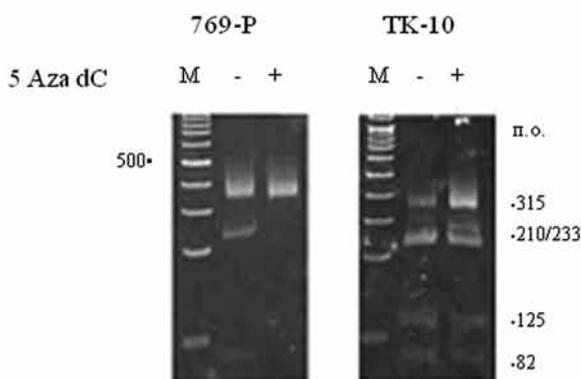


Рис. 2. Статус метилирования фрагмента F315 в клеточных линиях карциномы почки 769-P и ТК-10, определенный методом COBRA. А, Схема участка промотора гена DUSP9. Стрелками обозначено положение фланкирующих праймеров F, Fn и R, используемых для амплификации фрагмента размером 315 п.о. (F315). Фрагмент F315 содержит 31 CpG-сайт (отмечены вертикальными линиями). Позиция каждого CpG-сайта (-188...+73) указана относительно сайта инициации транскрипции (Transcription Start Site, TSS). Овалами отмечены 4 CpG-динуклеотида, расположенные в сайтах CGCG, узнаваемых рестриктазой BstU1. Внизу указаны размеры фрагментов, образуемых в результате гидролиза F315 рестриктазой BstU1. Б, Снижение уровня метилирования CpG-сайтов в области F315 в клетках 769-P и ТК-10 после обработки деметилирующим агентом 5-Aza dC. (+)- клетки культивировались в присутствии 1 мкМ 5-Aza dC в течение 72 часов. (-) – контрольные, необработанные клетки. Гидролизированные фрагменты (210/233, 105 и 82 п.о.) соответствуют метилированным аллелям, фрагмент 315 п.о. – неметилированным аллелям). М – маркер 100 bp GeneRuler (Thermo Fisher Scientific)

левые клетки, а активация экспрессии DUSP9 в опухолевых клетках подавляет их способность образовывать опухоли у мышей и ингибирует рост привитых опухолей [7]. Механизмы инактивации гена DUSP9 пока не известны. Результаты нашего исследования с использованием клеточных линий рака почки человека показывают, что экспрессия DUSP9 коррелирует с уровнем метилирования промоторной области гена. Аналогичные результаты были получены Wu et al. на клеточной линии рака желудка человека - MKN-1 [12].

При анализе клинических образцов ПКК мы обнаружили, что статус метилирования промоторного участка DUSP9 в опухолевой ткани зависит от пола пациента. У 91% женщин было выявлено гиперметилирование исследованной области в опухоли по сравнению с нормальной тканью. У мужчин метилированные CpG-сайты в этой области не обнаружены ни в нормальной, ни в опухолевой тканях. Ранее другими исследовательскими группами анализировался уровень метилирования промотора DUSP9 у пациентов с

колоректальным раком и раком желудка [5, 12]. Различия в метилировании ДНК DUSP9, связанные с полом пациента, в этих исследованиях обнаружены не были. Молекулярные механизмы влияния пола на метилирование ДНК малоизучены. Тем не менее, половые различия в уровне метилирования ДНК описаны как на уровне отдельных генов, так и на уровне всего генома. Например, у пациентов с раком легких уровень метилирования промотора гена RASSF1A в опухолевой ткани значительно выше у мужчин, чем у женщин [10]. При колоректальном раке опухоли с одновременным гиперметилированием промоторов многих генов (так называемый CIMP фенотип) встречаются у женщин в 8,8 раза чаще, чем у мужчин [11].

Таким образом, наше исследование доказывает, что одним из ранних событий в канцерогенезе почки может быть инактивация экспрессии DUSP9. Результаты, полученные на клеточных линиях опухоли почки, подтверждают возможное участие в подавлении экспрессии эпигенетических факторов. Обнаружено, что гиперме-

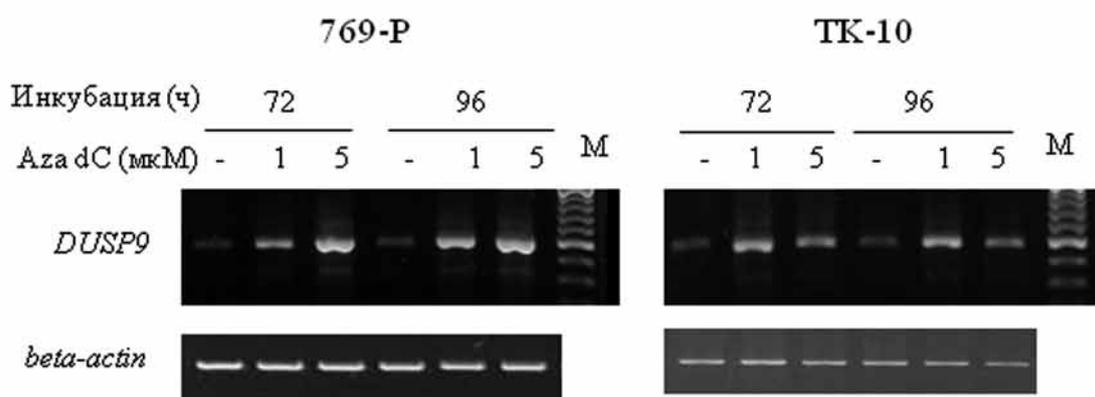


Рис. 3. Активация транскрипции DUSP9 в клетках линий 769-P и TK-10, обработанных деметилирующим агентом 5-Aza dC (+). M – маркер 100 bp GeneRuller (Thermo Fisher Scientific)

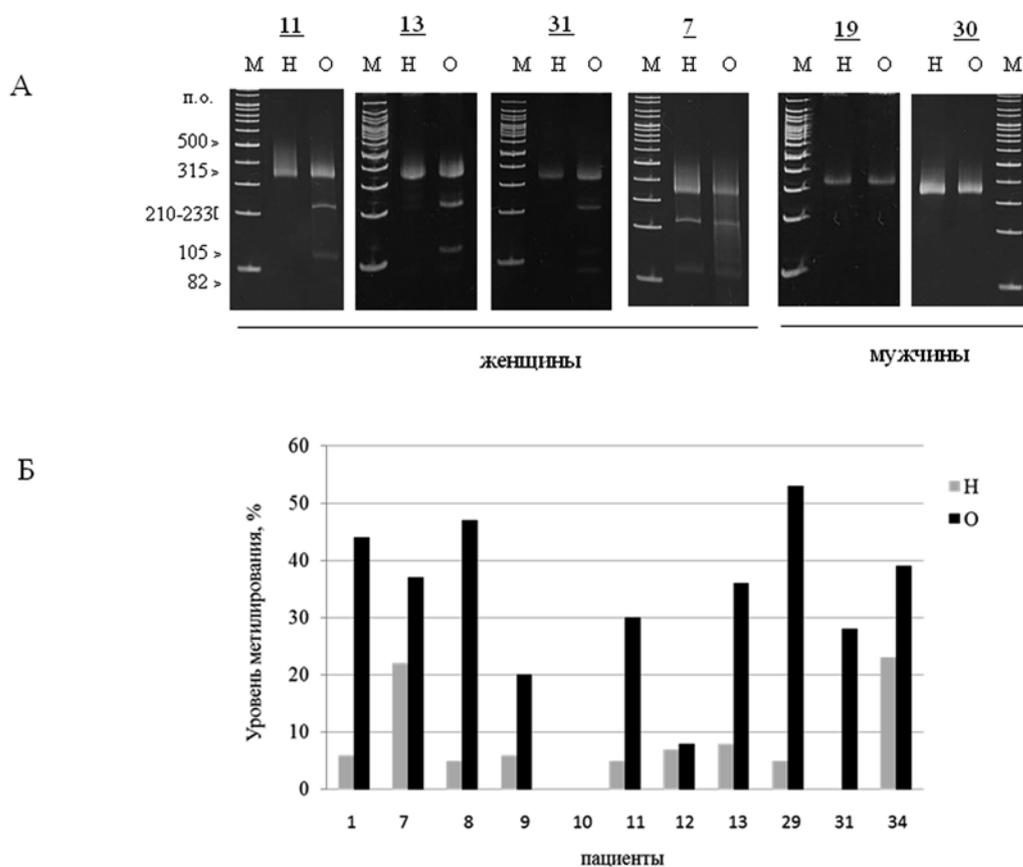


Рис. 4. Статус метилирования фрагмента F315 в клинических образцах, определенный методом COBRA. А – электрофоретическое разделение продуктов гидролиза F315 рестриктазой BstU1. Гидролизованые фрагменты соответствуют метилированным аллелям. В – количественная оценка уровня метилирования в опухоли и прилежащей условно нормальной ткани у женщин. О – опухолевая ткань, Н – прилежащая условно нормальная ткань почки. М – молекулярный маркер 100 bp GeneRuller (Thermo Fisher Scientific). * - положение фрагмента 500 п.о. Ни у одного из мужчин метилированных аллелей не обнаружено, поэтому они не приведены на рис. Номер пациента указан в соответствии с табл. 2.

тирование промоторного участка DUSP9 в опухолевой ткани характерно исключительно для женщин и не наблюдается у мужчин. Эти результаты указывают на то, что в подавление транскрипции гена DUSP9 в опухоли почки вовлечены и другие, пока не выясненные, механизмы.

ЛИТЕРАТУРА

- Cheburkin Y.V., Knyazeva T.G., Peter S. et al. Molecular portrait of human kidney carcinomas: The cDNA microarray profiling of kinases and phosphatases involved in the cell signaling control // *Molecular biology*. – 2002. – Vol. 36. – № 3. – P. 376-384.
- Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – P. 3279-90.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // *International journal of cancer*. – 2015. – Vol. 136. – № 5. – P. E359-E386.
- Gerlinger M. Rowan A. J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // *New England journal of medicine*. – 2012. – Vol. 366. – № 10. – P. 883-892.
- Jenner S., Wiedorn K.H. and Techel D. Development of a DUSP9 methylation screening assay // *Pathol Oncol Res*. – 2015. – Vol. 21. – P. 123-30.
- Liu J., Ni W., Xiao M. et al. Decreased expression and prognostic role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 4 in hepatocellular carcinoma // *J. Gastrointest Surg*. – 2013. – Vol. 17. – P. 756-765.
- Liu Y., Lagowski J., Sundholm A. et al. Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4 // *Cancer Res*. – 2007. – Vol. 67. – P. 10711-10719.
- Low H. B. and Zhang Y: Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer // *Immune Netw*. – 2016. – Vol. 16. – P. 85-98.
- Muda M., Boschert U., Smith A. et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4 // *J. Biol. Chem*. – 1997. – Vol. 272. – P. 5141-5151.
- Vaissire T., Hung R. J., Zaridze D. et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors // *Cancer Res*. – 2009. – Vol. 69. – P. 243-252.
- Wiencke J. K., Zheng S., Lafuente A. et al. Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. – 1999. – Vol. 8. – P. 501-506.
- Wu F., Lv T., Chen G. et al. Epigenetic silencing of DUSP9 induces the proliferation of human gastric cancer by activating JNK signaling // *Oncol. Rep*. – 2015. – Vol. 34. – P. 121-128.
- Wu S., Wang Y., Sun L. et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma // *BMC Cancer*. – 2011. – Vol. 26. – P. 413-420.
- Xiong Z. and Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay // *Nucleic acids research*. – 1997. – Vol. 25. – № 12. – P. 2532-2534.
- Yap T. A., Gerlinger M., Futreal P. A. et al. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees // *Sci. Transl. Med*. – 2012. – Vol. 4. – Issue 127. – P. 127ps10.
- Zhou L., Chen J., Li Z. et al. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – P. e15224.

Поступила в редакцию 14.01.2019 г.

E.I. Jakubovich, A.G. Polischouk, V.I. Evtushenko

Relationship between the inactivation of DUSP9 expression and hypermethylation of the gene promoter in renal-cell carcinoma

Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies, Saint-Petersburg

DUSP9 / MKP-4 belongs to a subclass of bispecific protein phosphatases, which, by dephosphorylation of MAP kinases (ERK1 / 2, p38 and JNK), negatively regulate the activity of MAP kinase cascades. Hyperactivation of MAP kinase cascades is observed in many different cancer types, including kidney cancer. We have previously found that in human clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) DUSP9 is downregulated. In this study, using the semi-quantitative RT-PCR method, we evaluated the expression level of DUSP9 in tumors of patients with different stages of renal cell carcinoma of three histological variants: ccRCC (26 samples), papillary (2 samples) and chromophobic (1 sample). For each tumor 3 distantly located pieces were analyzed. We showed that DUSP9 mRNA level was significantly reduced in all three pieces of each tumor compared with normal tissue.

Promoter hypermethylation may be one mechanism of gene repression in cancer. Using the DNA demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine and RCC cell lines we showed a correlation between the mRNA level and methylation level of the promoter region of DUSP9 gene. We then analyzed methylation level of DUSP9 promoter in 31 clinical samples of RCC (11 female and 20 male patients). It was increased in 10 out of 11 female RCC. In men, the methylated alleles of DUSP9 were not detected in either tumor or paired normal specimens. The results of our study indicate that DUSP9 transcriptional repression is an early event in kidney carcinogenesis and that DUSP9 expression in RCC can be regulated epigenetically via DNA methylation of the gene promoter, in a sex-related manner. They also indicate the existence of alternative mechanisms of inactivation of the DUSP9 gene in RCC.

Key words: renal-cell carcinoma, tumor suppressor, DUSP9 / MKP-4