

ГОРОДЕЦЬКА Є.В.^{1✉}, СЕРГА С.В.¹, СТАХОВСЬКИЙ Е.О.², КОНОНЕНКО О.А.²,
СТАХОВСЬКИЙ О.Е.², ПКУЛЬ М.В.² ДЕМІДОВ С.В.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини»,

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: liza.gorodetskaya@gmail.com

² Національний інститут раку, відділення пластичної та реконструктивної онкоурології,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

✉ liza.gorodetskaya@gmail.com, (093)488-34-85, (093)150-07-76

МУТАЦІЯ 6174DELТ В ГЕНІ BRCA2 У ЧОЛОВІКІВ З УКРАЇНИ, ХВОРИХ НА РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Мета. Мутації в генах BRCA1/2 підвищують ризик захворювань на рак грудної залози, рак підшлункової та передміхурових залоз у чоловіків. В Україні мутації генів BRCA1/2 вивчалися лише у жінок, а ситуація із захворюваннями, пов'язаними з порушенням роботи цих генів у чоловіків, залишається майже не дослідженою. Мутація 6174delT є мутацією зсуву рамки зчитування і призводить до зупинки транскрипції та в подальшому трансляції функціонального білка BRCA2. **Методи.** Для виділення геномної ДНК використовували периферійну кров. Аналіз зразків ДНК 116 чоловіків, хворих на рак передміхурової залози, на наявність мутації в гені BRCA2 (6174delT) проводили методом мультипраймерної ПЛР. **Результати.** Серед продіагностованих нами проб не було виявлено жодної мутації в гені BRCA2 у пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози. **Висновки.** Отримані нами результати дозволяють передбачити, що частота цієї мутації складає не більше, ніж 0,9% серед чоловіків в Україні, хворих на рак передміхурової залози.

Ключові слова: мутація, 6174delT, BRCA2, рак передміхурової залози, Україна.

BRCA1 і BRCA2 є генами-супресорами пухлин, мутантні фенотипи яких призводять до різних видів раку, зокрема таких, як рак молочної залози, рак яєчників, рак передміхурової залози, а також рак молочної залози у чоловіків, рак підшлункової залози та меланома шкіри [1, 2]. Дослідження показали, що білки BRCA беруть участь у різноманітних клітинних процесах. Зокрема, обидва гени беруть участь у репарації ДНК та регуляції транскрипції, клітинного цик-

лу та апоптозу у відповідь на ушкодження ДНК [3, 4]. В Україні частоти мутацій генів BRCA1/2 вивчалися лише у жінок [5, 6], а ситуація із захворюваннями, пов'язаними з порушенням роботи цих генів у чоловіків, залишається майже не дослідженою. Мутація 6174delT є мутацією зсуву рамки зчитування і призводить до зупинки транскрипції та в подальшому трансляції функціонального білка BRCA2.

Метою цієї роботи був пошук мутації 6174delT в гені BRCA2 у чоловіків із захворюванням на рак передміхурової залози (РПЗ) як форми захворювання, для якої притаманний зв'язок із вищезгаданою мутацією [7, 8].

Матеріали і методи

У дослідження були залучені 116 чоловіків, хворих на рак передміхурової залози. Отримання інформаційної згоди пацієнтів та встановлення діагнозу проведено в Національному інституті раку. Вік чоловіків становив від 59 до 75 років. Для виділення геномної ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) використовувалася периферійна кров, яку зберігали не більше доби. До свіжої крові додавали розчин ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) у кількості 100 мкл 3% розчину на 1 мл крові та залишали за +4°C у холодильнику. Виділення ДНК проводили фенольним методом за стандартним протоколом. Наявність мутації в гені BRCA2 (6174delT) визначали методом мультипраймерної ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) з використанням специфічних праймерів [9] з власними модифікаціями. Для виявлення мутації шляхом мультипраймерної ПЛР використовували дві реакції ПЛР. У першій реакції використовували один

© ГОРОДЕЦЬКА Є.В., СЕРГА С.В., СТАХОВСЬКИЙ Е.О., КОНОНЕНКО О.А.,
СТАХОВСЬКИЙ О.Е., ПКУЛЬ М.В. ДЕМІДОВ С.В., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

загальний праймер та один праймер, специфічний для мутації, а у другій реакції – один загальний праймер і один праймер, специфічний до алеля дикого типу. Послідовності праймерів використані відповідно до літературних даних [9], розміри відповідних ампліфікованих фрагментів наведені в таблиці.

ПЛР проводили за схемою, наведеною в літературі [9], з власною оптимізацією: 3 хв. за 95°C, 35 циклів, кожен із яких передбачав по 30 с за 94°C, 40 с за 57°C та 30 с за 72°C, а кінцева стадія елонгації 5 хв. за 72 ° C. Реакція проводилась у суміші 20 мкл (3 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10x ПЛР-буфера (10X DreamTaq Buffer, «Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2 mM dNTP («Thermo Scientific», USA), 3 мкл 20 mM праймерів P1 та P3, 1 мкл 20 mM праймера P2, 0,25 мкл 20 mM праймерів P4, P5 та P6, 0,7 мкл 20 mM праймерів P7 та P9, 0,6 мкл 20 mM праймера P8, 1 мкл Taq-полімерази (1 од.акт/мкл «Thermo Scientific», USA), 3 мкл дистильованої води), яка готувалася для всіх проб разом, а вже потім додавалася ДНК.

Після ПЛР 4 мкл суміші з продуктами реакції переносили на 8% поліакриламідний гель (6,5 мл дистильованої води, 2,7 мл поліакриламідну (29 г акриламід, 1 г бісакриламід, 100 мл дистильованої води), 1 мл 10xTBE (108 г Tris base, 55г борної кислоти, 40 мкл 0.5M EDTA), 70 мкл 10% персульфату амонію та 15 мкл TEMED (тетраметилетилендіамін). Сила струму становила 35 mA, а напруга 190 В.

Результати та обговорення

РПЗ є другою найбільш поширеною формою раку у чоловіків у всьому світі та займає шосте місце серед найпоширеніших причин смерті [10]. У результаті аналізу ДНК 116 хворих на рак передміхурової залози в жодній із досліджених нами проб мутації 6174delT у гені *BRCA2* не були виявлені (рис.). Отже, частота

досліджуваної події складає не більше 0,9% в досліджуваній групі особин.

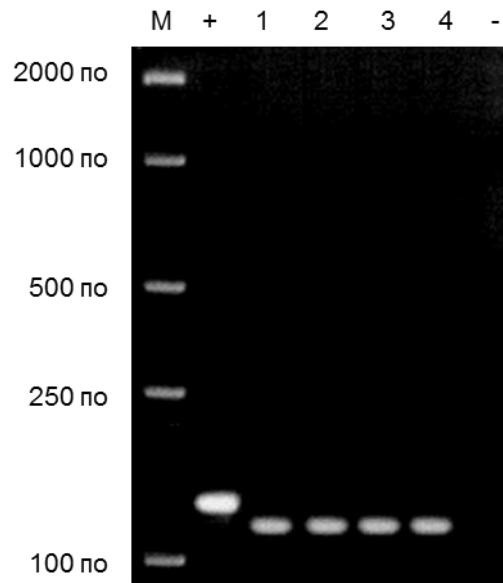


Рис. Приклад електрофореграми результатів ПЛР (м – маркер Quantitas Fast DNA Marker 100bp - 2Kb («Biozym», Germany); «+» – контрольний зразок із мутацією 6174delT; 1 – 4 – ДНК хворих на рак передміхурової залози; «-» – негативний контроль із водою).

Результати дослідження частоти мутацій у генах *BRCA1/2* у світі демонструють, що серед 2481 продіагностованого учасника з 62 центрів 20 країн світу був виявлений 731 чоловік, який мав *BRCA2* мутації [11]. Частота виявлення РПЗ склала відповідно 2,4% (59 із 2481 чоловіків). Частота виявлення мутацій для гена для *BRCA1* склала 2,3% (18 із 791) серед хворих на РПЗ та 1,9% (10 із 531) серед контрольних зразків, а для гена *BRCA2* – 3,3% (24 з 731) для пацієнтів з РПЗ та 1,6% (7 із 428) для контролів.

Таблиця. Використані в експерименті праймери

Праймер	Послідовність праймера	Розмір ампліфікованих фрагментів
<i>BRCA2</i> – 6174delT		
Загальний праймер (P7)	5'-agctggctctgaatgttcgttact	
Специфічний для алеля дикого типу (P8)	5'-gtgggatttttagcacagctagt	151 пн
Специфічний для мутації (P9)	5'-cagtctcatctgcaaatattcagggatttttagcacagcatgg	171 пн

Беручи до уваги географічну мінливість у захворюваності на рак, дані аналізувалися за такими регіонами, як Північна Америка, Австралія, Азія, а також Західна, Центральна та Південна Європа, при цьому не було виявлено статистично значущих відмінностей [10]. Також, наприклад, у США шляхом сиквенування ділянок інтронеку в гені *BRCA2* були продіагностовані наявність мутацій 290 пацієнтів з округу Кінг штату Вашингтон; у 2 були виявлені мутації в 11 екзоні гена *BRCA2*, що складає 0,6% [11]. У Великобританії серед 38 діагностованих випадків сімейного РПЗ були виявлені дві мутації в гені *BRCA2* та жодної в гені *BRCA1*, що становить 5% [12]. Виходячи з вищезазначених частот, відібрані нами для аналізу зразки є вкрай малочисельними для отримання відповід-

ного результату.

Оскільки мутації в генах *BRCA1/2* пов'язані у чоловіків не тільки з РПЗ, а також і з іншими поширеними формами раку, проведення дослідження із залученням достатньо великої вибірки пацієнтів з оглядом на встановлені частоти цих мутацій в інших регіонах світу [10], дозволить як з'ясувати частоти таких мутацій в Україні загалом, так і передбачити перспективи лікування конкретного пацієнта зокрема.

Висновки

Серед продіагностованих нами проб не було виявлено жодної мутації в гені *BRCA2* у пацієнтів, хворих на РПЗ, що дозволяє передбачити, що частота цієї події складає не більше 0,9% серед чоловіків, хворих на РПЗ, в Україні.

References

1. Cavanagh H., Rogers Katherine M.A. The role of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. *Hered Cancer Clin Pract.* 2015. Vol. 13. P. 16. doi: 10.1186/s13053-015-0038-x.
2. Fentiman I.S., Fourquet A., Hortobagyi G.N. Male breast cancer. *The Lancet.* 2006. Vol. 367. P. 595–604. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68226-3.
3. Venkitemaran Ashok R. Functions of *BRCA1* and *BRCA2* in the biological response to DNA damage. *Journal of Cell Science.* 2001. Vol. 114. P. 3591–3598.
4. Boulton S.J. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society Transactions.* 2006. Vol. 34. P. 633–645. doi: 10.1042/BST0340633.
5. Gorodetska I.V., Serga S.V., Levkovich N.M., Lahuta T.I., Anikusko N.F., Tymovska Yu.O., Cheshuk V.Ie., Smolanka I.I., Sklyar S.Yu., Polenkov S.E., Boichenko O.I., Demydov S.V., Zhuk O.W., Kozeretka I.A. The frequency of *BRCA1* founder mutation c.5266dupC (5382insC) in breast cancer patients from Ukraine. *Hered Cancer Clin Pract.* 2015. Vol. 13. P. 19. doi: 10.1186/s13053-015-0040-3.
6. Gorodetska I., Serga S., Lahuta T., Ostapchenko L., Demydov S., Khranovska N., Skachkova O., Inomistova M., Kolesnik O., Svintsitsky V., Tsip N., Peresunko A., Kmit' N., Manzhura O., Rossokha Z., Popova O., Salomakhina H., Kyriachenko S., Kozeretka I. Prevalence of two *BRCA1* mutations, 5382insC and 300T>G, in ovarian cancer patients from Ukraine. *Familial Cancer.* 2017. Vol. 16. P. 471–476. doi: 10.1007/s10689-017-9978-9.
7. Thompson D., Easton D.F. Cancer incidence in *BRCA1* mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute.* 2002. Vol. 94. P. 1358–1365.
8. Lubinski J., Phelan C.M., Gadirian P., Lynch H.T., Garber J., Weber B., Tung N., Horsman D., Isaacs C., Monteiro A.N., Sun P., Narod S.A. Cancer variation associated with the position of the mutation in the *BRCA2* gene. *Familial Cancer.* 2004. Vol. 3. P. 1–10. doi: 10.1023/B:FAME.0000026816.32400.45.
9. Chan P.C., Wong B.Y., Ozcelik H., Cole D.E. Simple and Rapid Detection of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations by Multiplex Mutagenically Separated PCR. *Clinical Chemistry.* 1999. Vol. 45. P. 1285–1287.
10. Bancroft E.K., Page E.C., Castro E., Lilja H., Vickers A., Sjoberg D., Assel M., Foster C.S., Mitchell G., Drew K., Mæhle L., Axcrone K., Evans D.G., Bulman B., Eccles D., McBride D., van Asperen C., Vasen H., Kiemeny L.A., Ringelberg J., Cybulski C., Wokolorczyk D., Selkirk C., Hulick P.J., Bojesen A., Skytte A.B., Lam J., Taylor L., Oldenburg R., Cremers R., Verhaegh G., van Zelst-Stams W.A., Oosterwijk J.C., Blanco I., Salinas M., Cook J., Rosario D.J., Buys S., Conner T., Auzens M.G., Ong K.R., Hoffman J., Domchek S., Powers J., Teixeira M.R., Maia S., Foulkes W.D., Taherian N., Ruijs M., Helderman-van den Enden A.T., Izatt L., Davidson R., Adank M.A., Walker L., Schmutzler R., Tucker K., Kirk J., Hodgson S., Harris M., Douglas F., Lindeman G.J., Zgajnar J., Tischkowitz M., Clowes V.E., Susman R., Ramón y Cajal T., Patcher N., Gadea N., Spigelman A., van Os T., Liljegren A., Side L., Brewer C., Brady A.F., Donaldson A., Stefansdottir V., Friedman E., Chen-Shtoyerman R., Amor D.J., Copakova L., Barwell J., Giri V.N., Murthy V., Nicolai N., Teo S.H., Greenhalgh L., Strom S., Henderson A., McGrath J., Gallagher D., Aaronson N., Ardern-Jones A., Bangma C., Dearnaley D., Costello P., Eyfjord J., Rothwell J., Falconer A., Gronberg H., Hamdy F.C., Johannsson O., Khoo V., Kote-Jarai Z., Lubinski J., Axcrone U., Melia J., McKinley J., Mitra A.V., Moynihan C., Rennert G., Suri M., Wilson P., Killick E., IMPACT Collaborators, Moss S., Eeles R.A. Targeted prostate cancer screening in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: Results from the Initial Screening Round of the IMPACT Study. *European urology.* 2014. Vol. 65. P. 0302–2838. doi: 10.1016/j.eururo.2014.01.003.
11. Agalliu I., Karlins E., Kwon E.M., Iwasaki L.M., Diamond A., Ostrander E.A., Stanford J.L. Rare germline mutations in the *BRCA2* gene are associated with early-onset prostate cancer. *British Journal of Cancer.* 2007. Vol. 97. P. 826–831. doi: 10.1038/sj.bjc.6603929.
12. Gayther S.A., de Foy K.A., Harrington P., Pharoah P., Dunsmuir W.D., Edwards S.M., Gillett C., Ardern-Jones A., Dearn-

ley D.P., Easton D.F., Ford D., Shearer R.J., Kirby R.S., Dowe A.L., Kelly J., Stratton M.R., Ponder B.A., Barnes D., Eeles R.A. The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes *BRCA1* and *BRCA2* in familial prostate cancer. *Cancer Research*. 2000. Vol. 60. P. 2115–2121.

GORODETSKA I.V.¹, SERGA S.V.¹, STAKHOVSKY E.O.², KONONENKO A.A.², STAKHOVSKY O.E.², PIKUL M.V.², DEMYDOV S.V.¹, KOZERETSKA I.A.¹

¹*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre “Institute of Biology”, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail liza.gorodetskaya@gmail.com*

²*Ukrainian National Cancer Institute,*

Ukraine, 03022, Kyiv, Lomonosova str., 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

MUTATION 6174DELТ IN THE BRCA2 GENE IN MEN WITH PROSTATE CANCER IN UKRAINE

Aim. Mutations in *BRCA1/2* genes are known to increase the risk of human breast cancer, pancreatic cancer and prostate cancer. In Ukraine only mutations in woman *BRCA1/2* were studied, thus the situation with these diseases related to disturbance of these genes in Ukrainian men remains poorly explored. 6174delT is a frameshift mutation and its results in stop of transcription and translation of the functional protein BRCA2. **Methods.** Genomic DNA was purified from peripheral blood. We performed PCR analysis of 116 DNA from men with prostate cancer in order to detect presence of mutation in *BRCA2* gene (6174delT). To detect the mutation by mutagenically separated PCR, we used two PCR reactions. The first reaction used one general primer and one primer specific to the mutation, and the second reaction was with one general primer and one primer specific to the wild type allele. **Results.** Among screened samples no mutations in the *BRCA2* gene were found in prostate cancer patients. **Conclusions.** Our results suggest that the incidence of this event is not more than 0.9% among men with prostate cancer in Ukraine.

Keywords: mutation, 6174delT, *BRCA2*, prostate cancer, Ukraine.