

ДИНАМИКА АНОМАЛИЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ГЕНОВ ПРИ РАЗВИТИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2013 г. Н. А. Скрябин^{1*}, Е. Н. Толмачёва¹, И. Н. Лебедев^{1,3}, М. В. Завьялова^{2,3},
Е. М. Слонимская^{2,3}, Н. В. Чердынцева^{2,3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

² Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

³ Сибирский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, 634050

Поступила в редакцию 07.08.2012 г.

Принята к печати 11.10.2012 г.

Впервые в сравнительном аспекте изучен эпигенетический статус доброкачественных пролиферативных процессов, злокачественных новообразований молочной железы и метастазов в регионарные лимфатические узлы (РЛУ) с помощью метилочипа “GoldenGate Cancer Panel I” (“Illumina”, США). В каждой исследованной выборке выявлены дифференциально метилированные функциональные группы генов. При доброкачественных пролиферативных процессах аномалии метилирования обнаружены в генах, регулирующих клеточную пролиферацию и мобильность. В образцах ткани со злокачественным фенотипом аномальное метилирование наблюдали в генах, ответственных за клеточную дифференцировку и пролиферацию, а также за фосфорилирование белков и мобильность клеток. В образцах тканей с метастазами в РЛУ дифференциальное метилирование по отношению к неизмененному эпителию молочной железы выявлено в генах, регулирующих адгезию клеток, формирование анатомических структур, неоангиогенез, иммунный ответ, трансдукцию сигналов и фосфорилирование белков. Установлено, что ткани с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в РЛУ, в целом, характеризуются относительно низким уровнем эпигенетической вариабельности по сравнению с тканями первичной опухоли.

Ключевые слова: метилирование ДНК, метилочип “GoldenGate Cancer Panel I”, рак молочной железы.

DYNAMICS OF METHYLATION CHANGES WITHIN FUNCTIONAL GROUPS OF GENES DURING BREAST CANCER PROGRESSION, by N. A. Skryabin^{1*}, E. N. Tolmacheva¹, I. N. Lebedev^{1,3}, M. V. Zavyalova^{2,3}, E. M. Slonimskaya^{2,3}, N. V. Cherdynitseva^{2,3} (Research Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia; *e-mail: Nukulay@gmail.com; ²Research Institute of Oncology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia; ³Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia). For the first time in a comparative perspective the epigenetic status of the benign proliferative processes, breast cancer, and metastases to regional lymph nodes was studied using DNA methylation microarray “GoldenGate Cancer Panel I” (“Illumina”, USA). The functional groups of differentially methylated genes were identified in each set of samples. The genes that regulate cell proliferation and mobility were methylated in samples with benign proliferative processes. An aberrant methylation of the genes responsible for cell differentiation and proliferation, as well as protein phosphorylation and cell mobility was observed in the samples with malignant phenotype. Differential methylation of the genes that regulate cell adhesion, the formation of anatomical structures, angiogenesis, immune response, signal transduction, and protein phosphorylation was found in the samples with metastases to regional lymph nodes in comparison with the morphologically unaltered breast epithelium. The tissues from the benign proliferative processes and metastases to regional lymph nodes were generally characterized by a relatively lower level of epigenetic variability in comparison with the tissues of the primary tumor.

Keywords: DNA methylation, DNA Methylation Microarray “GoldenGate Cancer Panel I”, breast cancer.

DOI: 10.7868/S0026898413020134

Принятые сокращения: РМЖ – рак молочной железы; ДПП – доброкачественные пролиферативные процессы; РЛУ – регионарные лимфатические узлы.

* Эл. почта: Nukulay@gmail.com

В последнее время в мировой литературе начинают накапливаться данные, указывающие на значительный вклад эпигенетических aberrаций в инициацию и развитие злокачественного процесса [1–4]. Не вызывает сомнения и тот факт, что эпигенетические нарушения – важнейшие атрибуты клетки с уже инициированным злокачественным процессом. Следовательно, изучение эпигенетического статуса генома при раке необходимо как для более глубокого понимания механизмов злокачественной трансформации, так и для выявления нового поколения биомаркеров, что позволит усовершенствовать раннюю диагностику онкологических заболеваний. Однако большинство исследований, направленных на выяснение роли aberrантного метилирования ДНК в развитии злокачественных новообразований, ограничены тем, что в них анализируются заранее выбранные гены, которые принято считать патогенетически значимыми. Такой подход заранее ограничивает ценность получаемых результатов, поскольку огромный массив генов остается неисследованным. Использование биологических микрочипов лишено подобного ограничения, поскольку позволяет одновременно проанализировать характер метилирования отдельных CpG-сайтов большого количества генов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включен операционный материал от 41 пациентки с первично диагностированным раком молочной железы (РМЖ): 7 образцов ткани молочной железы с проявлениями доброкачественных пролиферативных процессов (ДПП), 40 образцов ткани первичной злокачественной опухоли, 6 образцов регионарных лимфатических узлов с метастазами и 6 условно-контрольных образцов, для которых морфологически подтверждено отсутствие изменений эпителия. Все больные, включенные в исследование, имели морфологически верифицированный операбельный РМЖ T1-4N0-3M0 и проходили лечение в клинике ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск) в 1996–2006 гг. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с “Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан” (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288) по разрешению комитетов по биомедицинской этике ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН и ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН.

Анализ профиля метилирования ДНК выполнен с использованием микрочипа “GoldenGate Methylation Cancer Panel I” (“Illumina”, США), включающего 1505 CpG-динуклеотидов 807 генов, большинство из которых представлено генами опухолевой супрессии и онкогенами с известными механизмами эпигенетической регуляции их экспрессии. Геномную ДНК подвергали би-

сульфитной конверсии с использованием набора “EZ DNA Methylation Kit” (“Zymo Research”, США), согласно протоколу производителя. Далее проводили полногеномную амплификацию и ферментативное расщепление ДНК на фрагменты, которые затем очищали и наносили на гибридационную матрицу. Во время гибридизации фрагменты ДНК отжигались на локус-специфичных ДНК-праймерах, соответствующих метилированному или неметилированному состоянию цитозина, и для последующего удлинения праймеров на одно основание использовали меченые ddNTP. Для считывания с матрицы сигналов флуоресценции использовали сканер “Illumina BeadArray Reader” (“Illumina”, США). Гибридизация образцов на чипе и детекция сигналов проведены на базе ЗАО “Геноаналитика” (г. Москва).

В результате проведенного анализа получены профили метилирования 1505 CpG-сайтов, однако в дальнейшее исследование включено только 1260 CpG-сайтов, относящихся к 730 генам. Остальные 245 сайтов либо детектировались с низким уровнем достоверности, либо локализовались на X-хромосоме. Достоверность детекции оценивается эмпирически – в сравнении с отрицательным контролем. В данном случае в качестве “нулевой гипотезы” мы принимали отсутствие специфической гибридизации исследуемых образцов на микрочипе. Соответственно, если вероятность неспецифической гибридизации меньше уровня значимости, то нулевая гипотеза отклоняется. В проведенном нами исследовании уровень значимости составлял 5%. Гены, локализованные на X-хромосоме, исключены из исследования по причине случайной инактивации одного гомолога у женщин посредством метилирования ДНК, ацетилирования гистонов и других эпигенетических модификаций. Феномен X-инактивации делает невозможной адекватную интерпретацию полученных результатов.

Полученные на микрочипе данные анализировали с помощью программного пакета “GenomeStudio Methylation Module” (“Illumina”, США), который переводит величину флуоресценции в количественную величину β (индекс метилирования), соответствующую отношению флуоресцентных сигналов метилированных CpG-динуклеотидов к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных CpG-динуклеотидов каждого анализируемого локуса. Величина β непрерывна и может принимать любое значение от 0 до 1, где 0 соответствует состоянию, когда все CpG-сайты в данном положении неметилированы, а 1 указывает на полное метилирование всех гомологичных CpG-динуклеотидов. Программный пакет “GenomeStudio Methylation Module” использует параметр “DiffScore” для представления значимости различий в уровне метилирования данного CpG-локуса в двух образцах или группах.

$$\text{DiffScore} = 10\text{sign}(\beta_{\text{cond}} - \beta_{\text{ref}})\lg 10p,$$

где β_{cond} – β исследуемого CpG-сайта, β_{ref} – β CpG-сайта в контрольной выборке, p – вероятность того, что интенсивность флуоресцентного сигнала от исследуемой последовательности отличается от контрольного сигнала.

$\text{DiffScore} > |20|$ соответствует $p < 0.01$. Отрицательная величина DiffScore отражает гипометилированное состояние CpG-локуса по сравнению с контролем, а положительная – гиперметилированное.

Для каждого CpG-сайта рассчитывали величину $\Delta\beta$ – разность в уровнях метилирования между CpG-локусом опытного и контрольного образцов. Эта величина показывает статистически значимое отличие индекса метилирования β в двух сравниваемых CpG-сайтах не менее чем на 0.17, что определяется разрешающей возможностью данного метилочипа [5].

Для выявления дифференциально метилированных генов задавали следующие критерии. Гены считались неметилированными в контрольном образце, если индекс метилирования их CpG-динуклеотидов был менее 0.17, что соответствует уровню разрешения используемого метилочипа. Среди этих генов в анализируемых образцах выявлены те, у которых индекс метилирования CpG-сайтов был более 0.34 (индекс метилирования в контроле плюс ошибка метода, $0.17 + 0.17$), что указывает на aberrантное метилирование этих динуклеотидов. Также в контроле отметили CpG-динуклеотиды, индекс метилирования которых был более 0.83 ($1 - 0.17$), что соответствует их метилированному состоянию. В анализируемых образцах среди этих CpG-сайтов выбрали те, индекс метилирования которых менее 0.66 (уровень метилирования в контроле минус ошибка метода, $0.83 - 0.17$), что указывает на их гипометилированное состояние.

Классификация дифференциально метилированных генов по функциональным группам проведена с использованием веб-ресурса Gene Set Analysis Toolkit V2 (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>), в котором оценивается представленность генов, сгруппированных по классификации “Gene Ontology” (<http://www.geneontology.org>) в геноме человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При сравнении образцов с доброкачественными изменениями эпителия молочной железы с гистологически нормальным эпителием из 1260 отобранных для исследования CpG-сайтов выявлено 26 (2.06%) дифференциально метилированных. Из них гиперметилированными и гипометилированными оказались по 13 CpG-сайтов. В 14 CpG-сайтах (53.8%) дифференциальное метилирование обнаружено для более 30% образцов, при

этом в восьми CpG-сайтах наблюдалось увеличение, а в шести – снижение уровня метилирования. Гиперметилированные гены по функциональным свойствам относились к следующим группам (по классификации “Gene Ontology”): гены, ответственные за регуляцию адгезии клеток (GO:0030155) ($n = 2$); гены, участвующие в остановке клеточного цикла (GO:0007050) ($n = 2$); гены иммунного ответа (GO:0006955) ($n = 4$). Гипометилированные гены тоже относились к трем группам: гены, ответственные за межклеточную адгезию (GO:0016337) ($n = 2$); гены, ответственные за подвижность клеток (GO:0048870) ($n = 2$); гены, регулирующие рост клеток (GO:0001558) ($n = 3$) (табл. 1).

В группе образцов со злокачественными новообразованиями в сравнении с нормальными эпителиальными тканями выявлено 318 дифференциально метилированных CpG-сайтов (25.2%), из которых 252 (79.2%) показали увеличение, а 66 (20.8%) – снижение уровня метилирования. В этом случае большинство дифференциально метилированных CpG-сайтов встречалось в единичных образцах. Дифференциальное метилирование более чем в 30% образцов выявлено лишь в 62 CpG-сайтах (19.4%), 46 из которых оказались гиперметилированными (74.1%), а 16 – гипометилированными (25.9%), и только эти гены мы классифицировали по функциональным признакам согласно базе данных “Gene Ontology”. Гиперметилированные гены оказались представлены двумя группами: гены, индуцирующие клеточную дифференцировку (GO:0045597) ($n = 8$), и гены, регулирующие клеточную пролиферацию (GO:0042127) ($n = 12$). Гипометилированные гены относились к двум другим группам: регуляция миграции клеток (GO:0016477) ($n = 2$) и фосфорилирование белков (GO:0006468) ($n = 3$) (табл. 2).

В образцах ткани со злокачественными новообразованиями по сравнению с доброкачественными пролиферативными процессами выявлено 359 (28.4%) дифференциально метилированных CpG-сайтов, из которых 289 (80.5%) имело повышенный, а 70 (19.5%) – пониженный уровень метилирования. Большая часть найденных сайтов встречалась в единичных образцах. Дифференциальное метилирование с частотой не менее чем в 30% образцов обнаружено только в 85 CpG-сайтах (23.6%), 76 из которых оказались гиперметилированными (89.4%), а 16 – гипометилированными (10.6%). Гены, гиперметилированные при злокачественных новообразованиях по сравнению с доброкачественными пролиферативными процессами, представлены тремя группами: гены, вовлеченные в морфогенез анатомических структур (GO:0009653) ($n = 24$), органогенез (GO:0048731) ($n = 35$), и гены, регулирующие клеточную миграцию (GO:0016477) ($n = 15$). Гипометилированные гены относились к двум другим группам: гены, осуществляющие позитивную ре-

Таблица 1. Гены, дифференциально метилированные в образцах ткани молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами по сравнению с морфологически неизмененным эпителием

Статус метилирования	Функциональные группы генов	Гены	СpG-сайт*
Гиперметилирование	Регуляция адгезии клеток (GO:0030155)	<i>ARHGD1B</i> <i>IL8</i>	cg15450139 cg01548201
	Остановка клеточного цикла (GO:0007050)	<i>MAPK12</i> <i>IL8</i>	cg26416296 cg01548201
	Иммунный ответ (GO:0006955)	<i>HLA-DRA</i> <i>HLA-DPA1</i> <i>ARHGD1B</i> <i>IL8</i>	cg25258233 cg11451043 cg15450139 cg01548201
Гипометилирование	Межклеточная адгезия (GO:0016337)	<i>DSG1</i> <i>CTGF</i>	cg13834042 cg15155239
	Подвижность клеток (GO:0048870)	<i>CTGF</i> <i>S100A2</i>	cg15155239 cg21074565
	Регуляция клеточного роста (GO:0001558)	<i>CTGF</i> <i>DDR2</i> <i>DDR2</i>	cg15155239 cg22740835 cg23028772

* Примечание к таблицам 1–4: локализация CpG-сайта приведена согласно аннотации производителя метилочипа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL9183>

Таблица 2. Гены, дифференциально метилированные в злокачественных опухолях молочной железы по сравнению с морфологически неизмененным эпителием

Статус метилирования	Функциональные группы генов	Гены	СpG-сайт*	Гены	СpG-сайт*
Гиперметилирование	Позитивная регуляция клеточной дифференцировки (GO:0045597)	<i>APC</i>	cg21634602	<i>NGFR</i>	cg02052412
		<i>STAT5A</i>	cg18292634	<i>NGFB</i>	cg02459758
	Регуляция клеточной пролиферации (GO:0042127)	<i>KIT</i>	cg23927351	<i>TAL11</i>	cg00875272
		<i>GFI1</i>	cg25402655	<i>GFBP3</i>	cg12826145
		<i>PTGS2</i>	cg03367301	<i>NGFB</i>	cg02459758
		<i>SPARC</i>	cg03769306	<i>PDGFRA</i>	cg27645880
		<i>STAT5A</i>	cg18292634	<i>KIT</i>	cg23927351
		<i>APC</i>	cg21634602	<i>NGFR</i>	cg02052412
		<i>CD40</i>	cg20698532	<i>IGFBP7</i>	cg10799769
<i>CD81</i>	cg04069951	<i>IGFBP3</i>	cg12826145		
Гипометилирование	Миграция клеток (GO:0016477)	<i>S100A2</i>	cg21074565	<i>CCKAR</i>	cg08845028
		Фосфорилирование белков (GO:0006468)	<i>RIPK1</i>	cg24303123	<i>MAP3K8</i>
<i>BCR</i>	cg08146988				

гуляцию клеточных процессов (GO:0048522) ($n = 2$) и регуляцию клеточных макромолекулярных метаболических процессов (GO:0044260) ($n = 2$) (табл. 3).

В результате сравнения образцов ткани с метастазами в РЛУ и морфологически неизмененного эпителия молочной выявлено 93 дифференциально метилированных CpG-сайта (7.3%), из которых в 64 (68.8%) уровень метилирования повышен, а в 29 (31.2%) снижен. Поскольку из выявленных 93 дифференциально метилированных

генов 76 найдены только в одном образце, их не учитывали при формировании групп дифференциально метилированных генов по классификации “Gene Ontology”. Таким образом, в данной группе образцов дифференциально метилированными оказались 17 сайтов (1.3%), из которых 9 (52.9%) гиперметилированы, а 8 (47.1%) гипометилированы. В образцах с метастазами в РЛУ гиперметилированные гены представлены в четырех группах: регуляция адгезии клеток (GO:0030155) ($n = 2$); морфогенез анатомиче-

Таблица 3. Гены, дифференциально метилированные в злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными пролиферативными процессами молочной железы

Статус метилирования	Функциональные группы генов	Гены	СрG-сайт*	Гены	СрG-сайт*
Гиперметилирование	Морфогенез анатомических структур (GO:0009653)	<i>PAX6</i> <i>DCC</i> <i>FGF2</i> <i>ATP10A</i> <i>APC</i> <i>EPHB1</i> <i>ONECUT2</i> <i>NGF</i> <i>PLAT</i> <i>PLAT</i> <i>PDGFRA</i> <i>SOX1</i> <i>ISL1</i> <i>ISL1</i> <i>THY1</i>	cg06727689 cg22055405 cg03941587 cg06932470 cg21634602 cg24704286 cg15475634 cg02459758 cg00024388 cg02252925 cg27645880 cg23071766 cg13836786 cg14024101 cg18809507	<i>HOXA9</i> <i>HOXA9</i> <i>TBX1</i> <i>CSPG2</i> <i>SHH</i> <i>CD9</i> <i>TWIST1</i> <i>COL1A2</i> <i>COL1A2</i> <i>SOX17</i> <i>GFI1</i> <i>SLIT2</i> <i>PDGFRB</i> <i>PDGFRB</i>	cg10604830 cg03715906 cg03402455 cg02861411 cg02023134 cg01573484 cg01202666 cg22877867 cg26942275 cg19346665 cg25402655 cg13875122 cg21817429 cg12727795
	Органогенез (GO:0048731)	<i>APC</i> <i>ASCL2</i> <i>CD40</i> <i>CD40</i> <i>CD9</i> <i>CFTR</i> <i>COL1A2</i> <i>COL1A2</i> <i>CSPG2</i> <i>DCC</i> <i>DLK1</i> <i>EPHB1</i> <i>FGF2</i> <i>GDF10</i> <i>GFI1</i> <i>HOXA9</i> <i>HOXA9</i> <i>IGFBP3</i> <i>ISL1</i> <i>ISL1</i>	cg21634602 cg15376678 cg20698532 cg26940394 cg01573484 cg24329417 cg22877867 cg26942275 cg02861411 cg22055405 cg20175079 cg24704286 cg03941587 cg03251024 cg25402655 cg10604830 cg03715906 cg12826145 cg13836786 cg14024101	<i>KIT</i> <i>NGF</i> <i>NRG1</i> <i>ONECUT2</i> <i>PAX6</i> <i>PDGFRA</i> <i>PDGFRB</i> <i>PDGFRB</i> <i>PLAT</i> <i>PTGS2</i> <i>SHH</i> <i>SLIT2</i> <i>SOX1</i> <i>SOX17</i> <i>SPARC</i> <i>STAT5A</i> <i>TAL1</i> <i>TBX1</i> <i>THY1</i> <i>TWIST1</i>	cg23927351 cg02459758 cg15475634 cg06727689 cg27645880 cg21817429 cg12727795 cg00024388 cg02252925 cg03367301 cg02023134 cg13875122 cg23071766 cg19346665 cg03769306 cg18292634 cg00875272 cg03402455 cg18809507 cg01202666
	Клеточная миграция (GO:0016477)	<i>APC</i> <i>DCC</i> <i>FGF2</i> <i>IGFBP3</i> <i>ISL1</i> <i>ISL1</i> <i>KIT</i> <i>ONECUT2</i> <i>PDGFRA</i>	cg21634602 cg22055405 cg03941587 cg12826145 cg13836786 cg14024101 cg23927351 cg15475634 cg27645880	<i>PDGFRB</i> <i>PDGFRB</i> <i>PLAT</i> <i>PLAT</i> <i>SHH</i> <i>SLIT2</i> <i>SOX1</i> <i>THY1</i> <i>TWIST1</i>	cg21817429 cg12727795 cg00024388 cg02252925 cg02023134 cg13875122 cg23071766 cg18809507 cg01202666
Гипометилирование	Позитивная регуляция клеточных процессов (GO:0048522)	<i>NID1</i> <i>NID1</i>	cg20234959 cg16408295	<i>RUNX3</i>	cg10672665
	Клеточные макромолекулярные метаболические процессы (GO:0044260)	<i>NID1</i> <i>NID1</i>	cg20234959 cg16408295	<i>RUNX3</i>	cg10672665

Таблица 4. Гены, дифференциально метилированные в образцах метастазов в регионарные лимфатические узлы по сравнению с морфологически неизменным эпителием молочной железы

Статус метилирования	Функциональные группы генов	Гены	СрG-сайт*
Гиперметилирование	Регуляция адгезии клеток (GO:0030155)	<i>ARHGD1B</i> <i>IL8</i>	cg15450139 cg01548201
	Формирование анатомических структур, вовлеченных в морфогенез (GO:0048646)	<i>IL8</i> <i>MMP2</i>	cg01548201 cg20640526
	Развитие кровеносных сосудов (GO:0001568)	<i>IL8</i> <i>MMP2</i>	cg01548201 cg20640526
	Иммунный ответ (GO:0006955)	<i>HLA-DPA1</i> <i>ARHGD1B</i> <i>IL8</i>	cg11451043 cg15450139 cg01548201
Гипометилирование	Трансдукция сигналов (GO:0007165)	<i>BCR</i> <i>NPR2</i> <i>MAP3K8</i> <i>DDR2</i> <i>DDR2</i>	cg08146988 cg17151902 cg21555918 cg23028772 cg22740835
	Фосфорилирование белков (GO:0006468)	<i>BCR</i> <i>NPR2</i> <i>MAP3K8</i> <i>DDR2</i> <i>DDR2</i>	cg08146988 cg17151902 cg21555918 cg23028772 cg22740835

ских структур (GO:0048646) ($n = 2$); развитие кровеносных сосудов (GO:0001568) ($n = 2$); иммунный ответ (GO:0006955) ($n = 3$). Гипометилированные гены представлены двумя группами: трансдукция внутриклеточных сигналов (GO:0007165) ($n = 4$) и фосфорилирование белков (GO:0006468) ($n = 4$), причем в обеих группах оказались одни и те же гены (табл. 4).

В группе образцов с метастазами в РЛУ, по сравнению с доброкачественными пролиферативными процессами, выявлено 115 дифференциально метилированных СрG-сайтов (9.1%), из которых в 79 (68.7%) сайтах уровень метилирования увеличен, а в 36 (31.3%) снижен. Также как и в предыдущем случае, большинство (111) из 115 дифференциально метилированных СрG-сайтов обнаружено только в одном образце. Из 4 оставшихся генов (*SLC22A3*, *HTR1B*, *TNFRSF10D*, *HTR1B*) два относились к группе генов, регулирующих транспорт аминокислот (*HTR1B* и *SLC22A3*) (GO:0015837).

При сравнительном анализе образцов ткани с метастазами в регионарные лимфоузлы и образцов первичных опухолей выявлено 70 дифференциально метилированных СрG-сайтов (5.5%), из которых 47 (67.1%) с увеличенным, а 23 (32.9%) со сниженным уровнем метилирования. Из выявленных 70 дифференциально метилированных СрG-сайтов, 60 обнаружены в одном образце и потому не учитывались при классификации согласно "Gene Ontology". В результате выявлено 10 генов, 4 из которых относятся к генам, регули-

рующим трансдукцию сигналов (*WNT10B*, *NPR2*, *IL8*, *DDR2*) (GO:0007165).

При сравнении всех 4 исследованных групп образцов по соотношению числа гиперметилированных и гипометилированных СрG-динуклеотидов выявлены статистически значимые различия между злокачественными новообразованиями и доброкачественными пролиферативными изменениями эпителия (OR = 3.82; 95% CI: 1.57–9.27; $p = 0.001$), и эти различия заключаются в увеличении числа гиперметилированных СрG-сайтов в образцах тканей РМЖ. Также статистически значимые отличия наблюдались и при сравнении образцов с метастазами в РЛУ и первичными опухолями (OR = 1.73; 95% CI: 1.00–2.99; $p = 0.03$) – это увеличение числа гипометилированных СрG-сайтов в тканях РЛУ с метастазами. В то же время, важно отметить, что между доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в РЛУ статистически значимых отличий по соотношению числа гипер- и гипометилированных СрG-сайтов не выявлено (OR = 0.45; 95% CI: 0.17–1.20; $p = 0.06$).

В целом, число всех дифференциально метилированных генов в опухолевых тканях выше по сравнению с образцами тканей, в которых произошли доброкачественные пролиферативные изменения ($p < 0.0001$). Однако при сравнении первичных опухолей с метастазами в РЛУ, напротив, число дифференциально метилированных генов ($p < 0.0001$) существенно ниже в опухолях (рис. 1).

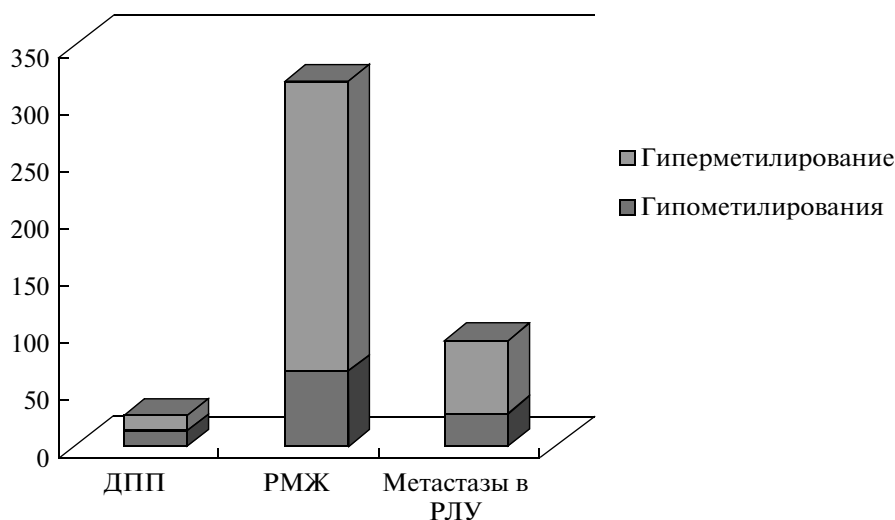


Рис. 1. Число дифференциально метилированных CpG-сайтов, обнаруженных в эпителии с доброкачественными пролиферативными процессами, злокачественными новообразованиями и в метастазах РЛУ по сравнению с морфологически неизменным эпителием.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нормальных соматических клетках метилирование ДНК играет ключевую роль в реализации многих биологических процессов, при этом наиболее изучена область, связанная с регуляцией экспрессии генов. Метилирование промоторных областей генов приводит к выключению экспрессии, а гипометилирование — к ее активации [6–8].

На основании полученных нами данных вырисовывается следующая картина. При доброкачественных пролиферативных изменениях эпителия молочной железы аномалии метилирования ДНК действуют двояко на одни и те же клеточные процессы. В частности, выявлено как ингибирование (гиперметилирование генов *IL8*, *DSG1*), так и стимулирование мобильности клеток (гипометилирование генов *CTGF*, *S100A2*). Известно, что повышение экспрессионной активности гена *CTGF* ассоциировано с метастазами в регионарные лимфатические узлы, поскольку данный ген увеличивает подвижность клеток за счет уменьшения их адгезии [9]. В проведенном нами исследовании выявлено гипометилирование гена *CTGF*, что может приводить к увеличению мобильности клеток. Также выявлено гипометилирование гена *DSG1*, который кодирует белок десмоглеин 1, ответственный за межклеточную адгезию [10]. Соответственно, можно полагать, что в исследованных тканях с доброкачественными изменениями межклеточные взаимодействия не нарушены и, в целом, наблюдается определенный баланс между ингибированием и стимулированием мобильности клеток, что в совокупности с другими генетическими и эпигенетическими аномалиями определяет их доброкачественный фенотип.

Кроме того, в исследованных тканях с доброкачественными процессами выявлено метилирование генов, участвующих в остановке клеточного цикла (*MAPK12*, *IL8*), что предполагает возможность стимуляции пролиферативной активности этих клеток посредством эпигенетических механизмов. Напротив, выявленное в работе гипометилирование гена *CTGF*, свидетельствует об ингибировании пролиферации в тканях опухолей молочной железы [9].

Противоречие в отношении влияния аномалий метилирования ДНК на характер клеточной мобильности и пролиферативной активности в тканях с доброкачественными изменениями может быть объяснено их морфологической гетерогенностью и отличиями в выраженности пролиферативных изменений эпителия. При этом лишь те клетки, которые обладают высоким пролиферативным потенциалом, могут быть связаны с высоким риском формирования злокачественной опухоли [11], и соответственно можно ожидать отличия профиля метилирования ДНК между доброкачественными процессами с различной степенью пролиферативной активности.

Наибольшее число дифференциально метилированных генов по отношению к контрольным образцам выявлено в первичных опухолях молочной железы, однако большинство из них встречалось в единичных образцах, что указывает на высокую гетерогенность данной группы по профилю метилирования ДНК. Среди гиперметилированных CpG-сайтов при анализе функциональных свойств обнаружена группа генов, регулирующих клеточную пролиферацию. Логично предположить роль этих генов как онкосупрессоров, однако среди них оказалось всего три гена с такими свой-

ствами (*SPARC*, *IGFBP7*, *APC*), остальные гиперметилированные гены известны как онкогены.

Ген *SPARC* кодирует онкосупрессорный белок, который регулирует связывание клеток с внеклеточным матриксом, подавляя инвазивную и метастатическую активность злокачественных клеток. Кроме того, этот ген ингибирует клеточную пролиферацию и стимулирует апоптоз в клетках опухолей молочной железы [12]. Ген *IGFBP7* также обладает онкосупрессорными свойствами – его продукт вовлечен в ингибирование ангиогенеза и активацию апоптоза [13]. Функции онкосупрессорного гена *APC* достаточно хорошо изучены – белок APC участвует в различных сигнальных путях, регулирует рост, апоптоз и миграцию клеток [14]. Кроме этого, в образцах ткани с РМЖ выявлены гиперметилированные гены, отвечающие за позитивную регуляцию клеточной дифференцировки, нарушение которой есть одно из ключевых условий злокачественной трансформации.

Гипометилированные гены в образцах со злокачественными опухолями относились к группам генов, ответственных за миграцию клеток и фосфорилирование белков. Это ключевые процессы в опухолевой прогрессии, поскольку обуславливают такие признаки злокачественного роста, как инвазия и метастазирование, а также ингибирование функций онкосупрессорных белков посредством фосфорилирования.

При сравнении образцов с метастазами в РЛУ с условно контрольными образцами выявлено ингибирование генов, стимулирующих неоангиогенез (*IL8*, *MMP2*) и мобильность клеток (*IL8*). Также обнаружено метилирование гена *ARHGD1B*, который ингибирует экспрессию протеогликана VCAN, ассоциированного с метастазированием во многих солидных опухолях [15]. Этот протеогликан представляет собой макрофагальный активатор рецепторов TLR2 и TLR6, участвующих в системе распознавания врожденного иммунитета, а также индуцирует экспрессию гена *TNF-α* миелоидными клетками. Гиперэкспрессия протеогликана VCAN в метастатических клетках приводит к возникновению очагов воспаления в тканях и органах иммунной системы [16]. Исходя из этого, можно предположить, что метилирование гена *ARHGD1B* в метастатических клетках вносит значительный вклад в возникновение преметастатической ниши в лимфатических узлах (рис. 2). Однако остается открытым вопрос о роли метилирования гена *ARHGD1B* в патогенезе доброкачественных пролиферативных процессов.

Несмотря на то, что вовлечение регионарных лимфоузлов в злокачественный процесс существенно повышает риск диссеминации, далеко не у всех больных отмечается отдаленное метастазирование, что свидетельствует о фенотипических и функциональных различиях клеток лимфогенных метастазов. Для более четкого прояснения

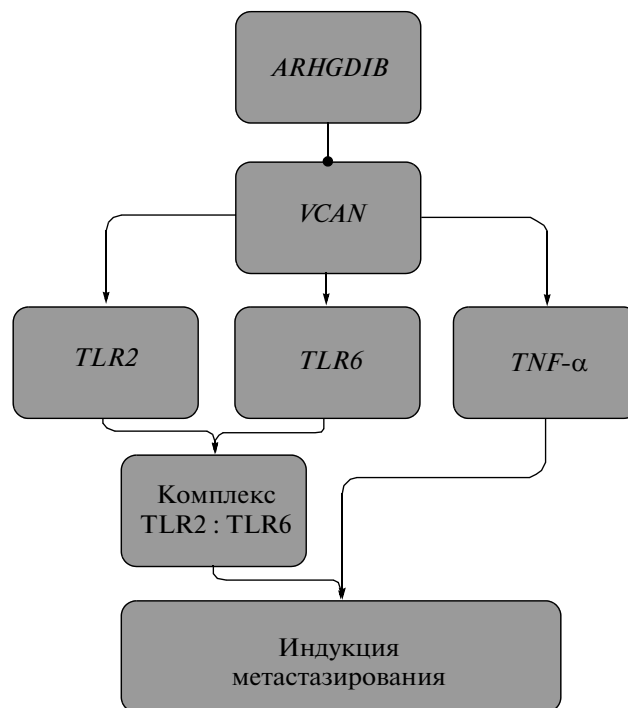


Рис. 2. Роль гена *ARHGD1B* в развитии процессов метастазирования.

—●— ингибирование; → — стимуляция.

связи метилирования указанных генов в метастатических лимфоузлах с опухолевой прогрессией необходима стратификация пациентов на группы по характеру клинического течения злокачественного процесса (наличие или отсутствие рецидивов, гематогенных метастазов в отдаленные сроки наблюдения после лечения).

При сравнении образцов с метастазами и эпителия с доброкачественными пролиферативными изменениями выявлено четыре дифференциально метилированных гена, два из которых регулируют транспорт аминокислот (*HTR1B*, *SLC22A3*). Известно, что аномалии метаболизма ароматических аминокислот могут иметь отношение, по крайней мере, к развитию рака мочевого пузыря [17].

Таким образом, в результате анализа метилирования ткани молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами, первичных злокачественных опухолей и регионарных метастазов выявлены дифференциально метилированные гены, которые мы сгруппировали по биологическим функциям, согласно базе данных “Gene Ontology”. В группе образцов с доброкачественными пролиферативными процессами дифференциально метилированными по отношению к образцам с неизменным эпителием оказались гены, регулирующие клеточную пролиферацию и мобильность. В группе образцов со злокачественным фенотипом дифференциальное метилирование в сравнении с контрольной

группой наблюдалось в генах, ответственных за дифференцировку, пролиферацию и мобильность клеток, а также за фосфорилирование белков. Полученные результаты не противоречат общей логике, так как все охарактеризованные гены патогенетически значимы для формирования и прогрессии злокачественных новообразований, и нарушение или активация их функций в результате аномалий метилирования обуславливает развитие характерных признаков злокачественных клеток.

При сравнении доброкачественных изменений эпителия со злокачественными новообразованиями в последних выявлен более высокий уровень эпигенетической вариабельности. Напротив, в регионарных метастазах профиль метилирования существенно не отличается от такового при доброкачественных пролиферативных процессах. Кроме того, обнаружено увеличение числа дифференциально метилированных CpG-сайтов в малигнизированном эпителии по сравнению с доброкачественными процессами, тогда как при сравнении опухолевых тканей с метастазами в регионарные лимфатические узлы, напротив, выявлено уменьшение числа дифференциально метилированных локусов. Эти результаты подтверждают полученные нами ранее данные, согласно которым образцы с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в РЛУ имеют очень похожие профили метилирования ДНК [18].

Таким образом, мы показали, что различные патологические процессы, наблюдаемые в ткани молочной железы у больных РМЖ, характеризуются разным профилем метилирования ДНК. Это указывает на значительную роль эпигенетических аномалий в возникновении различных патологических фенотипов клеток, что может вносить вклад в формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности.

Анализ связи функциональных нарушений указанных генов с объективными параметрами, характеризующими клиническое течение злокачественного процесса, позволит прояснить их роль в патогенезе РМЖ и выявить возможные прогностические маркеры или мишени для фармакотерапии.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЗАО “Геноаналитика” (г. Москва) за проведение гибридизации на метилочипе.

Исследование выполнено в рамках интеграционного проекта Сибирского отделения РАН “Молекулярно-генетические механизмы формирования и прогрессии рака молочной железы: разработка критериев риска, прогноза клинического течения и чувствительности к химиотерапии на основании выявления информативных маркеров опухоли и организма”, а также поддержано соглашением о гранте № 8602 Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Землякова В.В., Жевлова А.И., Стрельников В.В. и др. 2003. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы. *Молекуляр. биология*. **37**, 696–703.
2. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В. и др. 2004. Диагностика эпигенетической патологии при наследственных и онкологических заболеваниях. *Молекуляр. биология*. **38**, 213–223.
3. Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148–1159.
4. Feinberg A.P. 2010. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. *Virchows Arch.* **456**, 13–21.
5. O’Riain C., O’Shea D.M., Yang Y., et al. 2009. Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia*. **23**, 1858–1866.
6. Costello J.F., Plass C. 2001. Methylation matters. *J. Med. Genet.* **38**, 285–303.
7. Ehrlich M. 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. **21**, 5400–5413.
8. Plass C., Soloway P.D. 2002. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 6–16.
9. Chien W., O’Kelly J., Lu D., et al. 2011. Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int. J. Oncol.* **38**, 1741–1747.
10. Getsios S., Amargo E.V., Dusek R.L., et al. 2004. Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation*. **72**, 419–433.
11. Hartman A.R. 2005. The problems with risk selection; scientific and psychosocial aspects. *Recent Results Cancer Res.* **166**, 125–144.
12. Nagaraju G.P., Sharma D. 2011. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. *Cancer Treat. Rev.* **37**, 559–566.
13. Chen D., Yoo B.K., Santhekadur P.K., et al. 2011. Insulin-like growth factor-binding protein-7 functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6693–6701.
14. Zhen L., Lei Y., Dong-Xu C., et al. 2007. Methylation status and protein expression of adenomatous polyposis coli (APC) gene in breast cancer. *Chinese J. Cancer.* **26**, 586–590.
15. Said N., Sanchez-Carbayo M., Smith S.C., Theodorescu D. 2012. RhoGDI2 suppresses lung metastasis in mice by reducing tumor versican expression and macrophage infiltration. *J. Clin. Invest.* **122**, 1503–1518.
16. Kim S., Takahashi H., Lin W., et al. 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. **457**, 102–107.
17. Menashe I., Figueroa J.D., Garcia-Closas M., et al. 2012. Large-scale pathway-based analysis of bladder cancer genome-wide association data from five studies of European background. *PLoS One*. **7**, e29396.
18. Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. 2011. Эпигенетика процесса раннего лимфогенного метастазирования при раке молочной железы. *Вопросы онкологии*. **57**, 717–721.