

На правах рукописи

КУЗНЕЦОВА Екатерина Борисовна

**Идентификация и характеристика новых маркеров
метиляции и экспрессии генов, вовлеченных в
канцерогенез, при раке молочной железы**

03.00.15 "Генетика"

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2006 г.

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики Медико-генетического
научного центра РАМН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
В.В. Стрельников

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор В.В. Носиков;
доктор биологических наук,
профессор А.В.Поляков.

Ведущая организация: НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Защита диссертации состоится " " _____ 200_ г.
в ____ час. на заседании Диссертационного Совета Д 001.016.01 по адресу:
Москва, 115478, ул. Москворечье, дом 1.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГНЦ РАМН.

Автореферат разослан " " _____ 2006 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета
доктор биологических наук
профессор

Л.Ф. Курило

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Основными задачами онкогеномики являются изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и разработка оптимальных методов предупреждения, диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. В связи с этим особое значение приобретает проблема идентификации генов, вовлеченных в канцерогенез, и их подробная характеристика. Один из подходов к решению этой задачи основывается на анализе эпигенетических особенностей генома опухолей. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов подразумевает изменения генома, отличные от структурных вариаций кодирующих областей генов. К эпигенетическим явлениям относятся, в частности, метилирование-деметилирование ДНК и гистонов, ацетилирование-деацетилирование гистонов, полиморфизмы повторяющихся последовательностей в регуляторных областях генов.

В настоящее время разработан ряд методов, позволяющих выявлять аномально метилированные локусы в геноме опухолевой клетки. Идентифицированные с помощью подобных методов гены в дальнейшем характеризуются с точки зрения их молекулярной патологии при канцерогенезе, в частности, оценивается их экспрессия, структурные нарушения и метилирование в норме и патологии. Особое внимание целесообразно уделять подробной характеристике особенностей метилирования изучаемых генов. Это обусловлено тем, что анализ маркеров метилирования на сегодняшний день является оптимальным инструментом молекулярно-генетической диагностики и мониторинга в онкологии. По специфичности он не уступает анализу экспрессии генов, значительно превосходя последний по простоте и доступности. Что же касается анализа структурных аномалий, он остается достаточно дорогостоящей процедурой и находит применение, в основном, в диагностике наследственных онкологических синдромов.

Анализ аномалий метилирования должен опираться на фундаментальную научную основу. В частности, необходимо значительно расширить генный состав применяемых диагностических панелей. Список хорошо изученных диагностических и прогностических маркеров метилирования не превышает на сегодняшний день двух десятков, причем многие из них не являются специфичными. Все применяемые маркеры должны быть четко охарактеризованы с точки зрения тканеспецифичности опухолей, информативности, особенностей метилирования CpG-островков в норме и при патологии.

Актуальность проблемы заключается в следующем:

1. Злокачественные новообразования относятся к одним из наиболее социально значимых болезней. Использование в клинической практике высокоинформативных предиктивных, диагностических и прогностических молекулярных маркеров канцерогенеза должно способствовать формированию

групп риска, раннему выявлению заболеваний, повышению эффективности дифференциальной диагностики, определению тактики лечения и контролю за его эффективностью.

2. Существующие панели молекулярно-генетических маркеров канцерогенеза не обеспечивают необходимого уровня эффективности диагностики, что объясняется, в первую очередь, недостатком всесторонне изученных маркеров.

3. На сегодняшний день одним из оптимальных инструментов молекулярно-генетической диагностики и мониторинга в онкологии является анализ маркеров метилирования. Тем не менее, выбор таких маркеров часто проводится на случайной основе без учёта эпигенетических характеристик конкретных геномных локусов. Совершенствование молекулярно-генетической диагностики онкозаболеваний невозможно без идентификации новых генов, вовлечённых в канцерогенез, и подробной характеристики особенностей эпигенетической регуляции их функционирования в норме и при патологии.

Цель и задачи исследования. Основной целью работы является идентификация и характеристика новых маркеров метилирования и экспрессии генов, вовлечённых в канцерогенез, при раке молочной железы.

Задачами исследования являются:

1. Оптимизация методологии скрининга дифференциального метилирования геномов нормальных и опухолевых клеток.
2. Идентификация локусов генома человека, аномально метилированных в образцах РМЖ и определение их принадлежности к конкретным генам.
3. Оценка частот метилирования CpG-островков выявленных генов в норме и при РМЖ.
4. Высокора разрешающее картирование метилирования CpG-островков изучаемых генов.
5. Изучение особенностей экспрессии исследуемых генов при РМЖ.
6. Оценка информативности выявленных эпигенетических маркеров канцерогенеза.

Научная новизна. В результате проведенного исследования разработана эффективная и экономичная модификация метода поиска дифференциально метилированных CpG-островков в геноме опухолевых клеток. На основании применения этой методики выявлено семь областей генома человека, дифференциально метилированных в ДНК из образцов тканей РМЖ и принадлежащих CpG-островкам генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BINI1*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*. Для указанных генов впервые проведен анализ метилирования их промоторных областей при РМЖ, а также в нормальных тканях молочной железы и лимфоцитах периферической крови здоровых доноров. Построены высокоразрешающие карты метилирования

СрG-островков генов *LAMC3*, *SEMA6B* и *BIN1*. Проведен количественный анализ экспрессии указанных генов в операционном материале РМЖ и клеточных линиях РМЖ. Показано снижение экспрессии генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BIN1*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1* в тканях РМЖ с частотами от 44% до 94%. Показано значительное снижение экспрессии генов *LAMC3* и *BIN1* в клеточной линии РМЖ MCF7 и генов *BIN1* и *SEMA6B* в клеточной линии РМЖ T47D.

Подробное исследование метилирования и экспрессии генов, выявленных в ходе работы, в злокачественных опухолях проведено впервые, а полученные результаты свидетельствуют о значительной роли эпигенетических факторов в регуляции функции этих генов при канцерогенезе.

Практическая значимость. Разработанная система скрининга дифференциального метилирования геномов высоко воспроизводима, подробно охарактеризована и может быть использована в дальнейшем в работах по характеристике эпигенетических нарушений, ассоциированных с социально значимыми заболеваниями. В настоящем исследовании скрининг дифференциального метилирования СрG-островков в 40 парных (опухоль и норма) образцах ДНК больных РМЖ позволил выявить семь генов, экспрессия которых подвержена аномальной эпигенетической регуляции при канцерогенезе: *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BIN1*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*. Разработаны методики мультилокусной метилчувствительной ПЦР для СрG-островков каждого из изучаемых генов, предназначенные для оценки статуса их метилирования в материале опухоли. В выборке из 98 образцов РМЖ проведена оценка частот аномального метилирования генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BIN1*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*. Анализ экспрессии перечисленных генов в 16 парных образцах ДНК больных РМЖ позволил провести предварительную оценку информативности снижения экспрессии каждого из генов как маркера канцерогенеза. Созданные карты метилирования соответствующих СрG-островков генов *LAMC3*, *SEMA6B* и *BIN1* и результаты проведённого экспрессионного анализа изучаемых генов представляют собой базу для разработки научно обоснованных систем эпигенетических маркеров канцерогенеза. Для генов *SEMA6B* и *LAMC3* определены наиболее выраженные функциональные изменения при РМЖ (частота аномального метилирования *SEMA6B* – 38%, частота не менее чем 10-кратного снижения экспрессии *SEMA6B* – 38%, частота не менее чем 10-кратного снижения экспрессии *LAMC3* – 59%). Полученные результаты позволяют рекомендовать включение этих генов в панели диагностических маркеров канцерогенеза.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанная модификация метилчувствительного фингерпринтинга является эффективной системой скрининга дифференциального метилирования геномов.
2. Промоторные области генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BINI*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1* подвергаются аномальному метилированию при РМЖ.
3. Разработаны карты метилирования CpG-динуклеотидов промоторных районов генов *LAMC3*, *SEMA6B* и *BINI*.
4. Экспрессия генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BINI*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1* нарушается при РМЖ, с преобладанием ее снижения для большинства изученных генов.

Апробация работы.

Материалы исследования были доложены на ежегодных конференциях Европейского общества генетики человека в 2005-2006 гг., на конференции Российского общества медицинских генетиков в 2005 г. (г. Уфа), на международной конференции «Биомедицина и биобезопасность» в 2005 г. (г. Москва), конференции по функциональной геномике Европейского Научного Фонда в 2005 г. (г. Осло). По результатам работы опубликовано 3 статьи и 5 тезисов. Решением Научного комитета Европейской конференции генетики человека (Амстердам, 2006) исследование признано лучшей научной работой коллектива молодых ученых.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 108 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (результаты и методы), описания результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 146 ссылок. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами и 28 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Материал для исследования был любезно предоставлен ГУ РОНЦ РАМН им. Н. Н. Блохина, Московским научно-исследовательским онкологическим институтом им. П.А. Герцена и донорским пунктом ММА им. И.М. Сеченова.

Все случаи РМЖ классифицированы по TNM согласно требованиям Международного противоракового союза (UICC, версия 1989 г.). Гистологическую идентификацию тканей проводили в отделе патоморфологии опухолей НИИ клинической онкологии РОНЦ РАМН и отделе патоморфологии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, где были получены серийные

срезы замороженных образцов опухолевых и прилежащих нормальных тканей.

Для получения ДНК необходимой степени чистоты геномную ДНК из лимфоцитов периферической крови и тканей выделяли стандартным методом (Sambrook et al., 1989). Выделение РНК проводили методом кислородной экстракции с использованием набора "РИБО-золь-А" (фирма АмплиСенс, Россия)

Рестрикцию ДНК и электрофорез проводили стандартными методами (Sambrook et al., 1989). В работе использовались рестриктазы RsaI, MspI и HpaII.

Разработана эффективная и экономичная модификация метода метилчувствительного фингерпринтинга (МЧФП), предназначенного для поиска дифференциально метилированных CpG-островков в геноме опухолевых клеток. В результате внесенных изменений исключены этапы радиоавтографирования гелей и клонирования продуктов реакции, расширены возможности визуального контроля на каждом этапе эксперимента.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартной схеме (Saiki, 1989) при помощи программируемого многоканального амплификатора ДНК «Терцик» фирмы ДНК-Технология с использованием термофильной ДНК-полимеразы Taq фирмы «ИнтерЛабсервис» г. Москва. В работе была использована метилчувствительная (МЧ-ПЦР) и метилспецифическая ПЦР (МС-ПЦР). Принцип методов МЧ-ПЦР и МС-ПЦР приведен в ранее опубликованных работах (Baur et al., 1999; Землякова и др., 2003).

Реакцию автоматического прямого секвенирования проводили на приборе ABI Prism 310, с использованием Genetic Analyzer Kits "Applied Biosystems" по протоколам производителя. Результаты секвенирования обрабатывали с использованием программы Chromas 3.01. Очистку продукта ПЦР для МС-секвенирования проводили согласно протоколу Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (BIO-RAD).

Реакцию обратной транскрипции РНК проводили методом случайного праймирования с использованием High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, США) по протоколу фирмы-производителя в термоциклере GeneAmp2700.

Анализ экспрессии изучаемых генов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени на приборе ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, США) с использованием зондов TaqMan, меченых флуоресцентным красителем FAM. Зонды и праймеры предоставлены фирмой Applied Biosystems. В качестве эндогенных контролей использованы гены *18S-rRNA*, *GAPDH*, *ACTB* и *B2M*.

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Blast и Fasta, Genbank Pustell, Genepro, WIN-SUN, Oligo 4.0, Executor и Chromas.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Оптимизация метода поиска аномально метилированных CpG-островков.

Оптимизация метода МЧФП проводилась с учетом недостатков, присущих более ранним модификациям и сводилась к повышению воспроизводимости результатов, снижению токсичности, себестоимости и трудоемкости исследований, расширению возможностей визуального контроля на каждом этапе эксперимента.

В целом, подготовка пулов анализируемых CpG-островков проходила по стандартной методике ПЦР в мягких условиях со статистическими G,C-богатыми праймерами (Gonzalzo et al., 1997). Однако мы отказались от использования радиоактивно меченых праймеров, применив вместо радиоавтографии метод визуализации продуктов фингерпринтинга в геле окраской нитратом серебра (рис. 1).

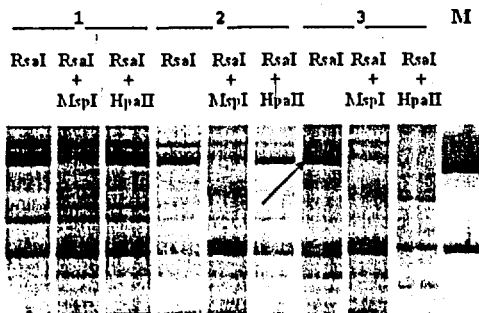


Рис.1. Пример визуализации продуктов фингерпринтинга в геле путем окраски нитратом серебра. 1, 2, 3 – образцы РМЖ, М – маркер молекулярного веса; стрелкой указан фрагмент, дифференциально метилированный в представленных образцах.

Проведенные нами эксперименты показали возможность четкого разделения продуктов фингерпринтинга в неденатурирующих полиакриламидных гелях (ПААГ), что позволило отказаться от использования денатурирующих агентов и гелей с низкой концентрацией акриламида. Такие нововведения значительно снизили токсичность, материальные и временные затраты, трудоемкость исследования. Кроме того, примененный способ окраски гелей позволил проводить непосредственный визуальный контроль за изоляцией интересующих фрагментов, а также обеспечил значительное

сокращение промежутка времени от анализа геля и выявления интересующих фрагментов до их реамплификации, что способствовало сохранению целостности фрагментов ДНК.

Процедура клонирования фрагментов ДНК, извлеченных из геля, которая применялась в первоначальной модификации метода, была заменена непосредственным прямым секвенированием с праймеров, используемых при постановке МЧФП. Основная проблема при этом заключается в том, что даже при использовании в МЧФП пары разных праймеров продукт амплификации с высокой вероятностью может быть фланкирован только одним из них. Решение проблемы основано на том, что все интересующие продукты МЧФП содержат, по крайней мере, один сайт узнавания рестриктазы *MspI*, поскольку именно по этому признаку и производятся их селекция. Гидролиз продуктов реамплификации участков CpG-островков, элюированных из ПААГ, этим ферментом приводит к образованию фрагментов различной длины, два из которых оканчиваются последовательностями, гомологичными праймеру. Секвенирование смеси рестриктос с этого праймера в подавляющем большинстве случаев приводит к получению информативной нуклеотидной последовательности, достаточно протяженной для однозначной идентификации искомого участка генома.

Идентификация дифференциально метилированных CpG-островков в образцах ДНК больных РМЖ.

С использованием разработанной модификации метода МЧФП проанализировано 40 парных (норма + опухоль) образцов ДНК больных РМЖ и выявлено 43 фрагмента, содержащих, по крайней мере, один сайт узнавания рестриктазы *MspI*. Среди этих фрагментов 25(58%) были метилированы и 11(26%) неметилированы во всех опухолевых образцах. Для 7(16%) фрагментов было показано дифференциальное метилирование, по крайней мере, в одной из пар образцов. Эффективность выявления дифференциально метилированных фрагментов ДНК с помощью разработанной нами модификации метода сопоставима с результатами, полученными другими авторами. Так в работе Liang, основанной на применении метода МЧФП, разработанного Conzalgo, дифференциально метилированные фрагменты составили 13,5% от общего количества полученных фрагментов (Liang G et al, 1998). Следует отметить, что эффективность метода во многом зависит от последовательности выбранных для эксперимента праймеров.

Результаты прямого секвенирования выявленных фрагментов позволили провести компьютерный анализ их последовательности, на основании которого эти фрагменты были идентифицированы как участки CpG-островков генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BIN1*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*. Аномальное метилирование указанных CpG-островков при РМЖ

продемонстрировано впервые. Из перечисленных генов лишь для одного, супрессора опухолевого роста *BIN1*, доказано участие в канцерогенезе, в то время как целенаправленного изучения роли молекулярной патологии других генов при раке не проводилось. Необходимо отметить, что, в соответствии с информацией, полученной из доступных баз данных, идентифицированные нами гены экспрессируются во всех изученных нормальных тканях человека. Наличие промоторных CpG-островков создаёт возможность для негативной регуляции экспрессии этих генов посредством аномального метилирования в процессе канцерогенеза. В связи с этим следующими задачами работы явились подробная характеристика особенностей метилирования выявленных CpG-островков в норме и при РМЖ и оценка экспрессии соответствующих генов в клетках РМЖ.

Характеристика метилирования исследуемых генов в нормальных тканях человека.

Поскольку ни для одного из исследуемых генов ранее не был определен статус метилирования в нормальных тканях, нами был проведён анализ их метилирования в 98 гистологически неизмененных образцах ткани молочной железы и 54 образцах ДНК из лимфоцитов периферической крови здоровых доноров методом МЧ-ПЦР со специфическими праймерами. При исследовании ДНК из лимфоцитов периферической крови нами не было выявлено ни одного случая метилирования изучаемых фрагментов. Также не было обнаружено метилирования ни одного из генов, кроме *SEMA6B*, в образцах условно нормальной ткани молочной железы. Метилирование гена *SEMA6B* выявлено в 3/98 (3%) образцах нормальной ткани молочной железы. Незначительное количество случаев аномального метилирования генов в нормальных тканях отмечалось во многих исследованиях. Метилирование генов *HIC1* и *p16* (по 8%) и гена *CDH1* (5%) выявлено в нормальной ткани яичников (Rathi et al., 2002). Melki и сотр. изучая метилирование генов *RB1*, *p16*, *p15*, *CDH1*, *ER* и *CALCA* в образцах костного мозга нормальных доноров, выявили низкий уровень метилирования для генов *p16*, *p15* и *CALCA* (Melki et al., 1999). Zochbauer-Muller, изучая профиль метилирования ряда генов при немелкоклеточном раке легкого, в качестве контроля исследовал прилежащую гистологически неизмененную ткань легкого и показал незначительный уровень метилирования (5%) гена *p14* (Zochbauer-Muller et al., 2001).

Анализ метилирования и экспрессии исследуемых генов в образцах опухолей РМЖ.

Анализ метилирования и экспрессии гена *BIN1*.

Одним из дифференциально метилированных фрагментов, выявленных нами методом МЧП, был участок CpG-островка, локализованного в 5'-области гена *BIN1*, кодирующего широко экспрессирующийся адапторный протеин, обладающий свойствами супрессора опухолевого роста. *BIN1* специфически взаимодействует с MYC, ингибируя его онкогенную активность. Поскольку MYC играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла как нормальных, так и неопластических клеток, усиление его онкогенной активности, вследствие повреждения *BIN1*, может приводить к малигнизации клеток (Ge et al, 2000).

Ген *BIN1* расположен на хромосоме 2q14.3, в локусе, для которого показана потеря гетерозиготности в 30-40% карцином молочной железы (Kerangueven et al., 1997). В ряде работ было показано нарушение экспрессии *BIN1* в клеточных линиях и образцах РМЖ (Sakamuro et al., 1996; Ge et al, 2000). Несмотря на наличие генетических повреждений *BIN1*, в частности делеций (потерь гетерозиготности), частота этих нарушений недостаточна для объяснения всех случаев потери экспрессии гена, что позволяет предположить значимую роль эпигенетических факторов, в частности, метилирования промотора гена. В литературе не обнаружено сообщений о наличии аномального метилирования CpG-островка промотора при каких-либо онкологических заболеваниях, однако Lodygin с соавт. показали реактивацию экспрессии *BIN1* в одной из трех клеточных линий рака простаты (Du-145) под действием 5-аза-2'-дезоксцитидина. Это позволяет предположить эпигенетический механизм регуляции экспрессии путем метилирования промотора гена (Lodygin et al., 2005).

Для оценки характера метилирования CpG-островка гена *BIN1* нами был выполнен дизайн специфических праймеров для идентифицированного фрагмента ДНК и разработан протокол мультилокусной МЧ-ПЦР, позволяющий объективно оценить полученные результаты. Частота метилирования в образцах ткани первичных опухолей молочной железы составила 18/98 (18%), кроме того, метилирование было обнаружено в ДНК из клеточных линий РМЖ MCF7 и T47D. В то же время, метилирования соответствующего участка в клеточных линиях рака простаты DU145 и LNCaP выявлено не было. Для подтверждения полученных результатов проведено метилспецифическое секвенирование исследуемого фрагмента ДНК в 10 образцах условно нормальной ткани молочной железы, 9 образцах РМЖ и четырёх клеточных линиях (MCF7, T47D, DU145 и LNCaP) (рис.2).

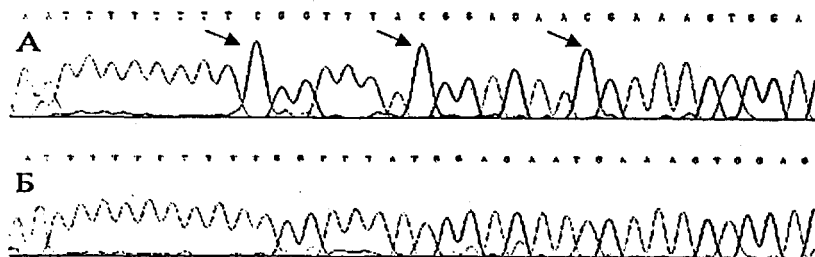


Рис.2. Результаты метилспецифического секвенирования фрагмента промоторного CpG-островка гена *BIN1*. А – метилированная последовательность, в качестве матрицы использована ДНК из клеточной линии MCF7; Б – неметилированная последовательность (ДНК из нормальной ткани молочной железы). Стрелкой указаны неизмененные цитозины.

Показано наличие метилированных остатков цитозина в составе всех проанализированных CpG-динуклеотидов в ДНК из тканей РМЖ и клеточных линий РМЖ. (рис.3., позиции с +838 по +979 нуклеотидов). Метилирования цитозина в ДНК из образцов нормальной ткани молочной железы и линий DU145 и LNCaP в соответствующих позициях выявлено не было (рис.3).

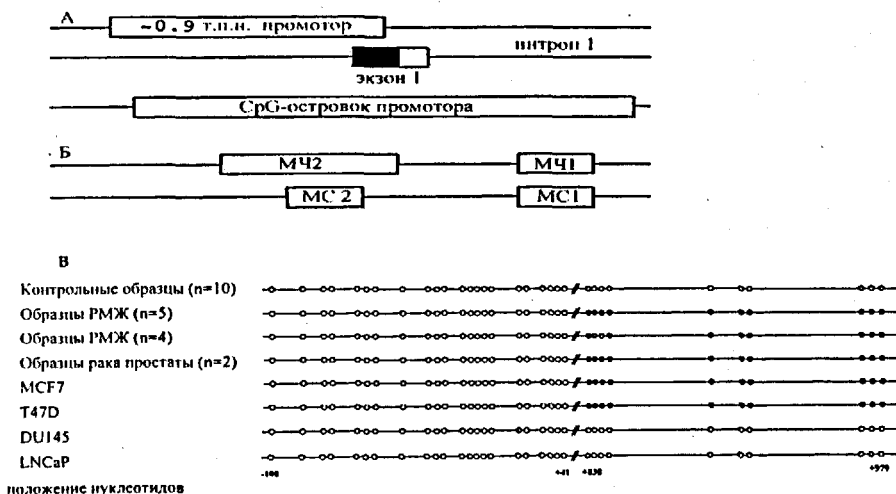


Рис.3. А – схема промоторной области гена *BIN1*, Б – локализация праймеров для МЧ- и МС-ПЦР, В – карта метилирования исследуемых участков CpG-островка.

Анализ экспрессии гена *BIN1* был выполнен методом ОТ-ПЦР в реальном времени и показал снижение или отсутствие экспрессии в 80% исследованных образцов опухолей. Исследование экспрессии проводилось по отношению к гистологически неизменной ткани для 13 пар образцов и двух клеточных линий РМЖ (рис.4).

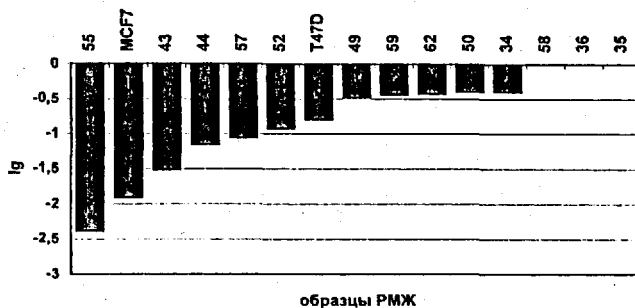


Рис.4. Анализ экспрессии гена *BIN1* в образцах РМЖ. На оси абсцисс отображены номера образцов РМЖ, на оси ординат - десятичный логарифм кратности относительного изменения экспрессии гена.

В клетках линии MCF7 наблюдается полная потеря экспрессии *BIN1*, в линии T47D экспрессия снижена в 6 раз, что хорошо согласуется с полностью метилированным состоянием исследованного фрагмента CpG островка гена в MCF7 и частично метилированным – в T47D. Экспрессия *BIN1* также снижена или отсутствует во всех исследованных образцах тканей РМЖ с метилированным участком промотора гена. Тем не менее, частота потери экспрессии *BIN1* значительно превосходит частоту аномального метилирования его CpG-островка, что не позволяет считать метилирование доминирующим механизмом инактивации этого гена.

Следует отметить, что идентифицированный нами дифференциально метилированный фрагмент локализован в 3'-области CpG-островка (интрон 1) гена *BIN1* и, согласно общепринятому мнению, его метилирование не может напрямую инактивировать экспрессию гена. Для оценки возможности прямого влияния метилирования промотора гена на экспрессию нами сконструированы праймеры для 5'-области CpG-островка и проведён анализ с помощью МЧ-ПЦР (30 образцов РМЖ) и метилспецифического секвенирования (9 образцов РМЖ). В результате этого исследования не выявлено ни одного случая метилирования, в том числе в образцах, где ранее было обнаружено метилирование участка 3'-области CpG-островка. Полученные данные совпадают с результатами исследования этой области, проведенного Lodygin и сотр. для рака простаты (Lodygin et al., 2005). Интерпретировать полученные результаты (метилирование фрагмента CpG-островка, расположенного за

пределами промотора, при онкозаболевании) можно соотнести их с подобными исследованиями других генов.

Промоторы достаточно большого числа генов имеют CpG-островки протяженностью свыше 1000 п.н., которые характеризуются гетерогенным статусом метилирования. Метилирование часто присутствует в 3'-областях CpG-островков, однако его роль в репрессии транскрипции не доказана (Tsutsumi et al., 1998; Abe et al., 2002). Подобный характер метилирования был показан для CpG-островков генов *CDKN2A* (Tsutsumi et al., 1998), *RASSF1A* (Yan et al., 2003), *MLH1* (Miyakura et al., 2001).

CpG-островок, локализованный в промоторной области *BINI*, имеет протяженность 1650 п.н. и захватывает 5'-регион, первый экзон и фрагмент первого интрона, включая таким образом и промоторные и непромоторные последовательности. Структурный и функциональный анализ последовательности фрагмента 5'-области островка размером примерно 900 п.н., прилежащего к первому экзону, показал, что он содержит консенсусные сайты для ряда транскрипционных факторов и достаточен для базовой транскрипции *BINI* (Wechsler-Reya et al., 1997). Мы предполагаем, что CpG-островок гена *BINI*, подобно островкам генов *CDKN2A* и *RASSF1A*, состоит из двух функционально неравнозначных частей: 3'-область достаточно часто и интенсивно метилируется, тогда как 5'-область в опухолях неметилирована. Полученные в ходе исследования результаты убедительно доказывают, что метилирование 3'-области CpG-островка является опухольспецифичным, и следовательно, может быть использовано при разработке панелей эпигенетических маркеров рака после оценки паттернов метилирования для различных типов опухолей.

Анализ метилирования и экспрессии гена *LAMC3*.

Ген *LAMC3*, локализованный на хромосоме 9q34.13, кодирует широко экспрессирующийся белок γ 3-цепи ламининов, семейства гликопротеинов внеклеточного матрикса, которые являются основными неколлагеновыми компонентами базальной мембраны (Koch et al., 1999).

Ламинины вовлечены в целый ряд биологических процессов, включая клеточную адгезию, дифференцировку, миграцию, передачу сигналов и метастазирование. Иммуногистохимический анализ экспрессии общего ламинина при РМЖ показал отсутствие экспрессии приблизительно в 50% карцином (Ioachim et al., 2002). В ряде работ было описано нарушение экспрессии цепей ламинина. При этом для α 3, β 3 и γ 2 цепей ламинина-5 отмечалось тканеспецифическое нарушение регуляции экспрессии в опухолях: в глиомах мозга и карциномах желудка было показано увеличение экспрессии, тогда как при раке простаты и базальноклеточных карциномах – снижение экспрессии (Martin et al., 1998; Nao et al., 1996). Недавние

исследования свидетельствуют о повышенном уровне (20-40%) метилирования генов, кодирующих цепи ламинина-5, при раке молочной железы, легких, мочевого пузыря, простаты (Sathyanarayana et al., 2003; Sathyanarayana et al., 2004). В результате исследования, проведенного на основе полногеномной гибридизации (CGH), Nessling и сотр. показали наличие делеции области 9q34, содержащей ген *LAMC3*, в образцах первичных опухолей молочной железы (Nessling et al., 2005). В настоящей работе нами было выявлено наличие дифференциального метилирования фрагмента CpG-островка гена *LAMC3* в образцах РМЖ, что послужило основанием для изучения характера метилирования и экспрессии этого гена.

Ген *LAMC3* содержит в 5'-области относительно небольшой CpG-островок, занимающий около 650 п.н. и содержащий 72 CpG-динуклеотида. CpG-островок полностью перекрывает первый экзон гена и содержит сайт инициации транскрипции. Фрагмент ДНК протяженностью 300 п.н., выявленный нами как дифференциально метилированный методом МЧФП и фланкирующий сайт инициации транскрипции, содержит 4 участка узнавания метилчувствительной рестриктазы HpaII, что создаёт предпосылки для успешного анализа его метилирования методом МЧ-ПЦР.

Аномальное метилирование указанного участка промотора *LAMC3*, исследованное методом мультилокусной МЧ-ПЦР, в образцах тканей первичных опухолей составило 8/98 (8%) (рис.5).

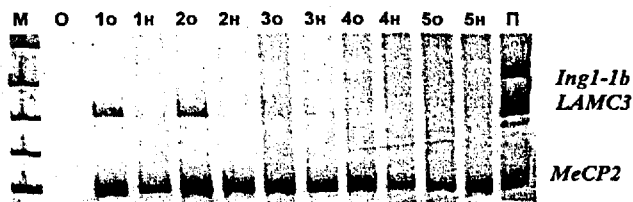


Рис. 5. Анализ метилирования промоторной области гена *LAMC3*. М - маркер молекулярного веса, О - отрицательный контроль, 1-5 - номера парных образцов РМЖ (о - опухоль, н - норма); 1,2 - метилирование промоторной области *LAMC3*, 3-5 - отсутствие метилирования, П - положительный контроль (негидролизованная ДНК).

Полученные результаты были подтверждены с помощью метилспецифического секвенирования.

Однако при последующем анализе экспрессии *LAMC3* в образцах опухолевых тканей больных РМЖ по отношению к гистологически неизменной ткани снижение экспрессии отмечалось в 94% образцов (рис.6). Значительное снижение экспрессии гена было выявлено и в клеточной линии MCF7. Повышения уровня экспрессии *LAMC3* не было отмечено ни в одном

из образцов первичных опухолей и было показано лишь для клеточной линии T47D.

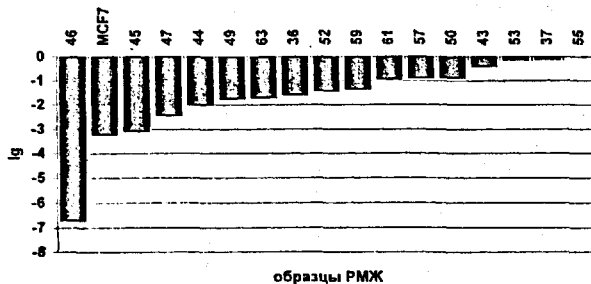


Рис.6. Анализ экспрессии гена *LAMC3* в образцах РМЖ. На оси абсцисс отображены номера образцов РМЖ, на оси ординат - десятичный логарифм кратности относительного изменения экспрессии гена.

Столь значительная разница между частотами метилирования промоторной области гена и снижением его экспрессии может объясняться действием дополнительных факторов (потеря гетерозиготности, мутации и т. д.). Это не исключает непосредственного влияния метилирования CpG-островка *LAMC3* на характер экспрессии гена, как это уже показано для *LAMA3*, *LAMB3* и *LAMC2* (Sathyanarayana et al, 2003), однако столь низкий процент аномального метилирования не позволяет использовать его как эффективный маркер РМЖ. В связи с этим нами был предпринят поиск участка CpG-островка *LAMC3*, метилирование которого могло бы быть ассоциировано с РМЖ в более высоком проценте случаев. Поскольку повышенные уровни метилирования характерны, как уже отмечалось, для 3'-участков CpG-островков генов, вовлечённых в канцерогенез, было проведено картирование метилирования дистального участка промоторного CpG-островка *LAMC3*. Однако метилспецифическое секвенирование выбранного участка выявило метилированное состояние всех проанализированных CpG-динуклеотидов как во всех исследованных образцах РМЖ, включая клеточные линии MCF7 и T47D, так и в образцах нормальной ткани молочной железы (рис. 7).

В целом для изученных генов субъединиц ламинина показаны относительно невысокие частоты метилирования промоторных областей при РМЖ: 40%, 5% и 15% для *LAMA3*, *LAMB3* и *LAMC2*, соответственно (Sathyanarayana et al., 2003) и 8% для *LAMC3* (настоящее исследование). Кроме того, особенности метилирования промоторных областей этих генов в норме исключают возможность использования анализа метилирования дистальных участков их CpG-островков в диагностических целях. Однако высокая частота снижения экспрессии (94%), показанная нами для гена

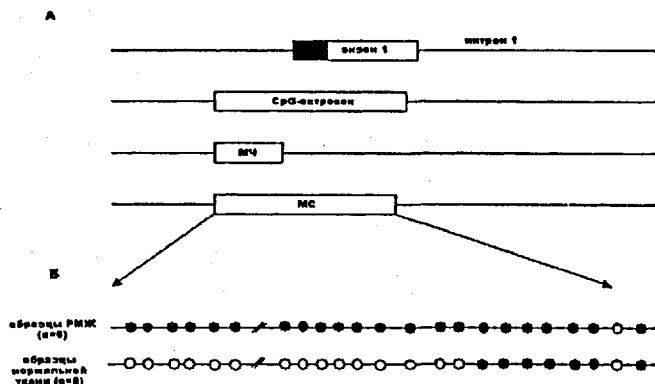


Рис.7. А - схема промоторной области гена *LAMC3* и локализации праймеров для МЧ- и МС-ПЦР, Б - карта метилирования исследуемого участка CpG-островка.

LAMC3 и нехарактерная для других генов субъединиц ламинина (10-55% для *LAMA3*, *LAMB3* и *LAMC2*; информативность экспрессионной панели из трёх генов 65%; Sathyanarayana et al., 2003) предполагает возможность использования этого показателя как высокоинформативного маркера РМЖ. Кроме того, дальнейшее изучение молекулярной патологии *LAMC3* может привести к идентификации доминирующего фактора снижения экспрессии гена и разработке более рационального маркера опухолевого процесса при РМЖ.

Анализ метилирования и экспрессии гена *SEMA6B*.

Ген *SEMA6B*, локализованный на хромосоме 19p13.3, кодирует семафорин 6В, относящийся к семейству семафоринов – белков, характеризующихся наличием консервативного SEMA-домена. В настоящее время насчитывается семь классов семафоринов, включающих как секреторные, так и трансмембранные формы, которые, по-видимому, задействованы в развитии центральной и периферической нервной системы. Первоначально считалось (по аналогии с первыми изученными представителями семейства), что функции семафоринов в нервной системе сводятся к регуляции направленного роста аксонов, однако для некоторых представителей семейства семафоринов уже показано участие в апоптозе, клеточной пролиферации и миграции, а также в определении метастатического потенциала опухоли (Chedotal et al., 2005).

В свете показанного в нашей работе дифференциального метилирования промоторной области *SEMA6B* при РМЖ, необходимо упомянуть, что

гиперметилирование промотора другого представителя семейства семафоринов, *SEMA3B*, было ранее описано при немелкоклеточном раке легкого (Kuroki et al., 2003). Недавние эксперименты по реактивации *SEMA3B* в клетках рака молочной железы показали, что он обладает свойствами гена-супрессора опухолевого роста с проапоптотическим действием.

Ген *SEMA6B* содержит небольшой (около 200 п.н.) CpG-островок, содержащий 24 CpG-динуклеотида и полностью перекрывающий первый экзон гена и сайт инициации транскрипции. Анализ статуса метилирования *SEMA6B* в образцах РМЖ был выполнен методом мультилокусной МЧ-ПЦР, anomальное метилирование выявлено в 37/98 (38%) образцах опухолей. Для подтверждения полученных результатов было проведено метилспецифическое секвенирование как метилированных, так и неметилированных образцов ДНК опухолей (рис.8).

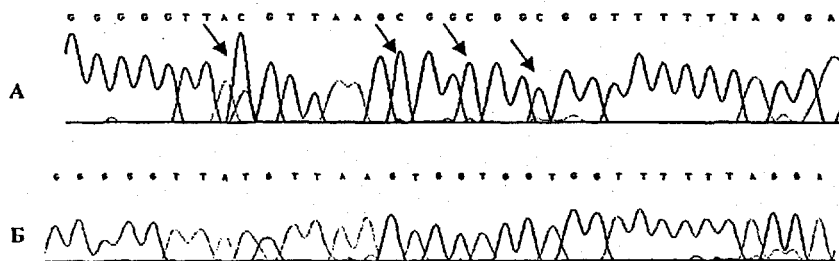


Рис.8. Результаты метилспецифического секвенирования фрагмента промоторного CpG-островка гена *SEMA6B*. А – метилированная последовательность, в качестве матрицы использована ДНК из материала опухоли; Б – неметилированная последовательность (ДНК из нормальной ткани молочной железы). Стрелкой указаны неизменные цитозины.

На основании данных секвенирования построена карта метилирования исследуемого района (рис.9).

Анализ экспрессии гена в образцах РМЖ по отношению к гистологически неизмененному контролю показал снижение экспрессии в 7/14 (44%) опухолях. В одном образце наблюдалась гиперэкспрессия *SEMA6B*, в 6/14 (50%) образцах уровень экспрессии совпадал с таковым в нормальной ткани (рис.10). В клеточной линии рака молочной железы MCF7 уровень экспрессии соответствовал таковому в нормальной ткани МЖ, в то время как в линии T47D наблюдалась потеря экспрессии исследуемого гена.

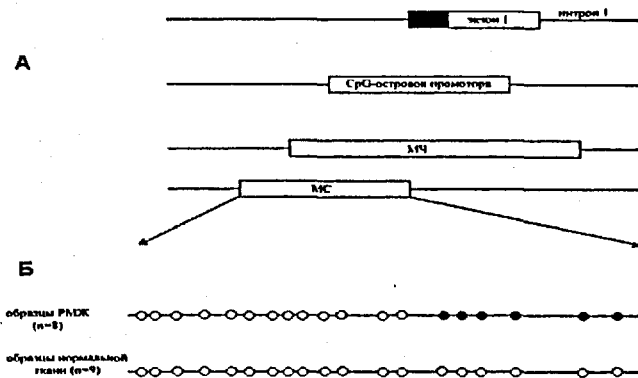


Рис.9. А - схема промоторной области гена *SEMA6B* и локализации праймеров для МЧ- и МС-ПЦР, Б – карта метилирования исследуемого участка CpG-острова.



Рис.10. Анализ экспрессии гена *SEMA6B* в образцах РМЖ. На оси абсцисс отображены номера образцов РМЖ, на оси ординат - десятичный логарифм кратности относительного изменения экспрессии гена.

Характеристика генов с низкими частотами метилирования при РМЖ.

Для четырех генов (*CACNG4*, *KCNH2*, *VCIP135* и *PSMTF1*), выявленных методом МЧФП, были показаны низкие частоты метилирования (менее 5%) в выборке образцов РМЖ.

Гены *CACNG4* и *KCNH2* кодируют белки потенциалзависимых ионных каналов, γ4- субъединицу кальциевого канала (CCG4) и калиевый канал HERG, соответственно. Внутриклеточный баланс ионов играет критическую роль во многих процессах развития, включая дифференцировку. Кроме того, известно, что приток ионов Ca^{2+} через кальциевые каналы является важным

фактором в ходе инициации таких стадий клеточной смерти как апоптоз, ишемия и комплемент-индуцированная цитотоксичность (Toyota et al., 1999). Активность калиевых каналов играет важную роль в сигнальных путях, обеспечивающих пролиферацию, дифференцировку и деление клеток. Последние исследования показали, что усиление потока ионов калия напрямую вовлечено в апоптоз (Yu et al., 1999) и канцерогенез (Pardo et al., 1999).

Ген *VCIP135* кодирует белок p135, содержащий OTU (*Drosophila* ovarian tumor) домен и взаимодействующий с валозинсодержащим белковым комплексом p97/p47 (VCP). Белок p97/VCP относится к AAA+ семейству АТФаз, представители которого вовлечены в широкий спектр различных клеточных процессов, включая протеолиз, репарацию ДНК и слияние мембран (Lupas et al., 2002).

Ген *PSMF1* кодирует субъединицу 1 протеосомного ингибитора (PI31), который играет важную роль в контроле гидролиза белков протеосомой 20S. Протеосомы удаляют аномальные белки из цитозоля, играют роль в активации транскрипционных факторов, в регуляции клеточного цикла (Zaiss et al., 2002). Таким образом, повреждения гена протеосомного ингибитора могут влиять на механизмы регуляции жизнедеятельности клетки опосредованно через нарушение функции протеосом.

Обобщая эти данные, можно предположить, что перечисленные гены могут играть значимую роль в канцерогенезе, в связи с чем нами был проведен анализ их экспрессии при РМЖ (рис. 11).

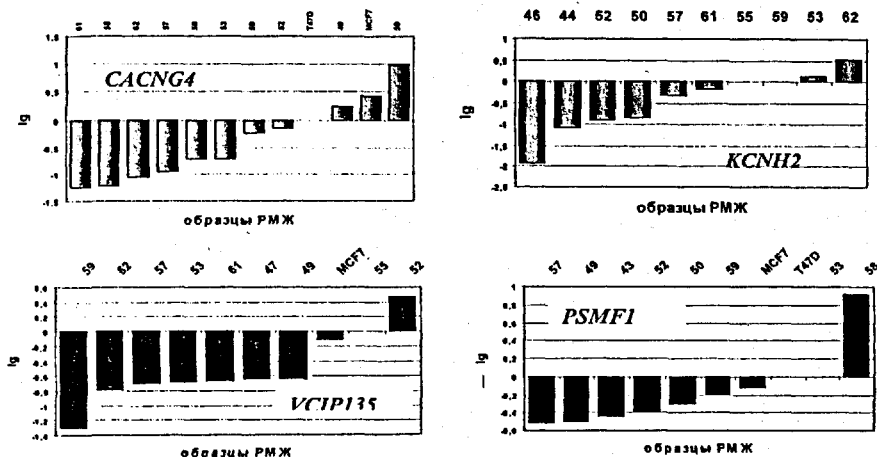


Рис. 11. Анализ экспрессии генов *CACNG4*, *KCNH2*, *VCIP135* и *PSMF1* в образцах РМЖ. На оси абсцисс отображены номера образцов РМЖ, на оси ординат - десятичный логарифм кратности относительного изменения экспрессии гена.

По результатам проведенного исследования снижение экспрессии указанных генов было показано с частотами от 60% до 80%, что позволяет считать их вовлеченными в канцерогенез при РМЖ.

Оценка эффективности модификации метода МЧФП и информативности выявленных эпигенетических и экспрессионных маркеров канцерогенеза.

Проведённое исследование показало, что МЧФП – простой и эффективный метод идентификации генов, вовлечённых в канцерогенез. Из семи идентифицированных транскриптов аномальное метилирование промоторных CpG-островков при РМЖ с частотой, превышающей 5% (от 7 до 38%) показано для четырёх. Таким образом, эффективность метода с точки зрения выявления аномального метилирования при раке составила более 50%. В то же время, показано значительное снижение экспрессии всех семи транскриптов (с частотами от 44% до 94%), что позволяет считать все выявленные гены вовлечёнными в канцерогенез. При этом сравнение результатов изучения метилирования и экспрессии генов показало, что, по крайней мере, для большинства из них метилирование промоторных CpG-островков не является доминирующим фактором регуляции транскрипции. В то же время, для генов с высокой частотой метилирования при РМЖ показано более значительное снижение экспрессии по сравнению с генами, CpG-островки которых метилируются при РМЖ редко. В частности, более чем 10-кратное снижение экспрессии часто метилируемых генов *SEMA6B*, *BINI* и *LAMC3* наблюдалось соответственно в 38%, 33% и в 59% образцов РМЖ, в то время как для редко метилируемых генов этот показатель составил от 10 до 33%.

Из исследованных генов наиболее выраженные изменения характера метилирования при РМЖ отмечены для *SEMA6B* (аномальное метилирование промоторной области в 38%).

Частоты метилирования большинства известных на сегодняшний день генов, вовлеченных в канцерогенез, при РМЖ колеблются в пределах от 5% до 40%. (Esteller et al., 2001; Herman et al., 1995; Землякова с соавт., 2003). Сообщения о крайне высоких (50-95%) частотах аномального метилирования генов при канцерогенезе должны подвергаться тщательной проверке в силу двух обстоятельств. Во-первых, в таких случаях метилирование не всегда бывает статистически достоверно повышенным именно в клетках злокачественных опухолей. Классическим примером является метилирование гена *HIC1* (hypermethylated in cancer), выявляемое как в нормальных, так и в опухолевых образцах (Rood et al., 2002), вследствие чего этот показатель не может считаться специфическим диагностическим маркером опухолевого процесса. Во-вторых, завышенные показатели метилирования могут явиться

следствием артефактов эксперимента. Так, метилирование гена *APC* было выявлено в образцах опухолей различного происхождения, в т.ч., рака молочной железы (Esteller et al., 2000; Pagella et al., 2004). Однако, в 2004г. было показано, что *APC* – ген, моноаллельно метилированный в нормальных тканях (Clement et al., 2004). Можно предполагать, что в предыдущих исследованиях метилирования *APC* не были соблюдены необходимые требования к чувствительности и специфичности методов анализа метилирования.

Таким образом, на сегодняшний день не известно маркеров метилирования ДНК, достоверно выявляемых в более чем 50% случаев первичного рака молочной железы и являющихся специфичными для неопластического процесса. Это обусловлено как артефактами ранних исследований, так и отсутствием масштабных исследований эпигенетических нарушений при РМЖ. В связи с этим, очевидно, что ближайшая перспектива эпигенетической диагностики РМЖ, основанной на анализе аномального метилирования ДНК – не за отдельными генами с предположительно крайне высокими уровнями метилирования, а за системами подробно охарактеризованных маркеров, специфичных для канцерогенеза и характеризующихся информативностью в пределах 40-50%. Показатель частоты метилирования промоторной области *SEMA6B*, выявленный в настоящем исследовании, позволяет рекомендовать проведение расширенного исследования эпигенетической патологии этого гена как при различных клинических формах РМЖ, так и в образцах опухолей различного происхождения, с целью включения в диагностические (прогностические) панели молекулярных маркеров канцерогенеза.

Показатели снижения экспрессии изученных нами генов (от 44% до 94%) позволяют считать каждый из них вовлеченным в процессы канцерогенеза с высокой частотой. Наиболее высокие частоты изменения экспрессии показаны в настоящем исследовании для генов *LAMC3* и *BIN1* (снижение экспрессии в 94% и в 80% образцов, соответственно). Тем не менее, при разработке экспрессионных маркеров канцерогенеза необходимо учитывать и такой параметр, как выраженность наблюдаемых изменений. При оценке диагностической ценности маркеров необходимо определение порогового значения изменения экспрессии, поскольку лишь выраженные отклонения позволяют детектировать изменения с помощью традиционных полуколичественных методов и диагностических экспрессионных микрочипов. Для оценки диагностической значимости маркеров нами установлен порог 10-кратного изменения экспрессии. Введение такого масштаба оценки экспрессии генов позволяет выявить изменения, детектируемые методом ОТ-ПЦР в реальном времени как $\Delta\Delta Ct > 3$ и доступные для идентификации традиционными методами при правильном

определении параметров (количества циклов) ПЦР. При установлении указанного порога высокая частота снижения экспрессии гена *BINI* (80%) обесценивается с диагностической точки зрения, составляя 33%. Показатели снижения экспрессии генов *LAMC3* и *SEMA6B* при этом страдают незначительно, снижаясь с 94% до 59% и с 44% до 38% соответственно, и могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве высокоинформативных маркеров нарушения экспрессии генов при канцерогенезе.

ВЫВОДЫ.

1. Разработана оригинальная модификация метода метилчувствительного фенгпринтинга: исключены этапы радиоавтографирования гелей и клонирования продуктов реакции, расширены возможности визуального контроля на каждом этапе эксперимента.

2. Использование разработанной модификации метода позволило идентифицировать 7 генов, подвергающихся аномальной эпигенетической регуляции при РМЖ: *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BINI*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*.

3. Определены частоты аномального метилирования промоторных CpG-островков выявленных генов при РМЖ. Значимые частоты аномального метилирования показаны для генов *SEMA6B*, *BINI*, *LAMC3* и *KCNH2* (38%, 18%, 8% и 7%, соответственно). Метилирование указанных генов не характерно для морфологически неизмененных тканей молочной железы.

4. Проведено картирование метилирования CpG-островков генов с высокими частотами метилирования (*SEMA6B*, *BINI*, *LAMC3*), что создаёт фундаментальную базу для разработки эффективных тест-систем анализа метилирования указанных генов.

5. Методом ПЦР в реальном времени показано снижение экспрессии генов *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *BINI*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1* в тканях РМЖ с частотами от 44% до 94%. Показано значительное снижение экспрессии генов *LAMC3* и *BINI* в клеточной линии РМЖ MCF7 и генов *BINI* и *SEMA6B* в клеточной линии РМЖ T47D.

6. Для генов *SEMA6B* и *LAMC3* определены наиболее выраженные функциональные изменения при РМЖ (частота аномального метилирования *SEMA6B* – 38%, частота не менее чем 10-кратного снижения экспрессии *SEMA6B* – 38%, частота не менее чем 10-кратного снижения экспрессии *LAMC3* – 59%). Полученные результаты позволяют рекомендовать включение этих генов в панели диагностических маркеров канцерогенеза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Кузнецова Е.Б., Дрозд О.В., Бабенко О.В., Землякова В.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. //Идентификация генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного ПЦР-фингерпринтинга.// Медицинская генетика. 2004, т. 3, № 12, с. 563-568.
2. Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В., Дрозд О.В., Бабенко О.В., Землякова В.В., Кекеева О.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В. // Поиск и характеристика новых маркеров метилирования и генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного фингерпринтинга. // Вестник НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М.Сеченова, 2005, № 5, с.73-88.
3. Strelnikov, V., Kuznetsova, E., Lyubchenko, L., Zaletayev, D. // Abnormal methylation of LAMC3, SEMA6B, VCIP135, KCNH2, PSMTF1, CACNG4, LAMR1 and BIN1 CpG islands in breast cancer. // Breast Cancer Res., 2nd ESF Functional Genomics Conference. Oslo, Norway 2005, p. 73.
4. M. Nemtsova, V. Zemlyakova, E. Kusnetsova, V. Strelnikov, L. Lyubchenko, D. Zaletayev. // Aberrant methylation analysis of carcinogenesis-associated genes in sporadic breast cancer. // Breast Cancer Res., 2nd ESF Functional Genomics Conference. Oslo, Norway 2005, p. 133
5. Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В., Дрозд О.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В. //Поиск и характеристика новых маркеров метилирования и генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного ПЦР-фингерпринтинга. // Тезисы второй международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», Москва, 2005, с. 168.
6. Кузнецова Е.Б., Дрозд О.В., Немцова М.В., Стрельников В.В. // Идентификация генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного ПЦР-фингерпринтинга. // V съезд российского общества медицинских генетиков, Уфа, Россия, «Медицинская генетика», № 5, с. 214, 2005.
7. Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В. // Методы анализа метилирования ДНК. // Медицинская генетика. 2006, № 10.
8. V.V. Strelnikov, E.B. Kuznetsova, M.V. Nemtsova, D.V. Zaletayev. // Identification of methylation and expression abnormalities associated with breast cancer. // European J. Hum. Genet., 2006, vol. 14, suppl. 1, p. 87.



Подписано в печать 03.07.06 г. Формат 60×84/16. Тираж 100 экз. Заказ № 344

Отпечатано в службе множительной техники ГУ РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина РАМН

115478, Москва, Каширское ш., 24

