

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ 5 ГЕНОВ ИЗ РАЙОНА 3P21.31 В ПАТОГЕНЕЗЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*

¹ *НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина
Минздрава РФ
(Москва, Россия)*

² *Научно-исследовательский
институт общей патологии
и патофизиологии
(Москва, Россия)*

³ *Институт
биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН
(Москва, Россия)*

⁴ *ФГАОУ ВО, Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава РФ
(Москва, Россия)*

⁵ *Медико-генетический
научный центр Российской
академии медицинских наук
(Москва, Россия)*

⁶ *ГБУЗ Московский
клинический научный центр
им. А.С. Логинова ДЗМ
(Москва, Россия)*

Д.А. Рябчиков¹, Е.А. Филиппова², И.В. Пронина², А.М. Бурденный^{2,3},
С.С. Лукина², Т.П. Казубская¹, И.К. Воротников¹, И.А. Дудина⁴,
А.М. Казаков¹, О.А. Талипов¹, В.И. Логинов^{2,5}, Э.А. Брага^{2,3,5}, К.С. Титов⁶

THE METHYLATION STATUS ROLE OF FIVE 3P21.31 REGION GENES IN THE MOLECULAR SUBTIPS OF BREAST CANCER PATHOGENESIS

*Д.А. Рябчиков¹
Доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник,
отделение хирургии опухолей
молочных желез,
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина,
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 23.*

*Е.А. Филиппова²
Аспирант,
лаборатория патогеномики и транс-
криптомики, НИИОПП,
125315, Москва, Балтийская ул., д. 8.*

*И.В. Пронина²
Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
лаборатория регуляции агрегатного
состояния крови.*

*А.М. Бурденный^{2,3}
Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,
лаборатория патогеномики
и транскриптомики.*

*С.С. Лукина²
Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,
научный сотрудник лаборатории
патогеномики
и транскриптомики.*

*Т.П. Казубская¹
Доктор медицинских наук,
старший научный сотрудник.*

*И.К. Воротников¹
Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий отделением хирургии
опухолей молочных желез.*

*И.А. Дудина⁴
Студент,
Московский государственный
медицинский университет
им. И.М. Сеченова,
119991, Москва, ул. Трубецкая,
д. 8, стр. 2.*

*А.М. Казаков¹
Клинический ординатор,
отделение хирургии опухолей
молочных желез,
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.
E-mail: kazakovich873@gmail.com.*

*О.А. Талипов¹
Аспирант, отделение хирургии
опухолей молочных желез.*

*В.И. Логинов^{2,5}
Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
лаборатория патогеномики
и транскриптомики.*

*Э.А. Брага^{2,3,5}
Доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
патогеномики и транскриптомики.*

*К.С. Титов⁶
Доктор медицинских наук,
доцент кафедры онкологии
и лучевой терапии,
РНИМУ им. Н.И. Пирогова;
заведующий онкохирургическим
отделением опухолей кожи
и мягких тканей,
московский клинический научный центр
им. А.С. Логинова ДЗМ,
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.*

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (исследовательский проект №18-315-00311 mol-a).

D.A. Ryabchikov¹

Doctor of Medicine, Senior Researcher,
Department of Breast Tumor Surgery,
N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
115478, Moscow, Kashirskoe Shosse, 23.

E.A. Filippova²

Postgraduate Student,
Laboratory of Pathogenomics and Transcriptometry,
Institute of General Pathology and Pathophysiology,
125315, Moscow, Baltiiskaya ul., 8.

I.V. Pronina²

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher,
Laboratory for the Regulation
of the Aggregate State of Blood.

A.M. Burdenny^{2,3}

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher,
Laboratory of Pathogenomics and Transcriptome.

S.C. Lukina²

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher,
Researcher of the Laboratory of Pathogenomics
and Transcriptome,
Research Institute of Epidemiology.

T.P. Kazubskaya¹

Doctor of Medicine,
Senior Researcher.

I.K. Vorotnikov¹

Doctor of Medicine, Professor,
Head of the Department of Surgery of Breast Tumors.

I.A. Dudina¹

Student,
Sechenov First Moscow State Medical University.

A.M. Kazakov¹

Resident,
Department of Breast Surgery,
N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
E-mail: kazakovich873@gmail.com.

O.A. Talipov¹

Postgraduate Student,
Department of Surgery of Breast Tumors.

V.I. Loginov^{2,5}

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher,
Laboratory of Pathogenomics and Transcriptometry.

E.A. Braga^{2,3,5}

Doctor of Biological Sciences, Professor,
Head of the Laboratory of Pathogenomics
and Transcriptometry,
Institute of General Pathology and Pathophysiology;
Research Center of Medical Genetics;
N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics,
Russian Academy of Sciences.

K.S. Titov⁶

Doctor of Medicine,
Associate Professor,
Department of Oncology and Radiation Therapy N.I.,
Russian National Research Medical University;
Head of the Oncosurgical Department of Skin
and Soft Tissue Tumors,
Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginova.

В последнее десятилетие было показано, что в многостадийном процессе образования опухолей нарушение функций клеточных генов может происходить не только в результате генетических событий (точечных мутаций, делеций, амплификаций), но и в результате эпигенетических изменений, в том числе локального гиперметиличивания ДНК. В последнее время применяются методы идентификации гиперметиличиванных районов ДНК, основанные на дифференциальном статусе метилирования CpG-островков в нормальных и опухолевых клетках.

Цель исследования. Изучить метилирование группы опухоль-ассоциированных генов (RASSF1A, RHOA, GPX1, DAG1 и USP4) в различных иммунологических подтипах рака молочной железы, оценить их связь с клиническим течением разных подтипов этого заболевания.

Методы. Анализ метилирования проводили в группах из 174 парных образцов опухоли и прилежащей гистологически неизменной ткани больных РМЖ и 20 образцов ткани молочной железы здоровых женщин. Использовались два независимых метода: метилспецифичная ПЦР (RASSF1A) и метилчувствительный рестрикционный анализ (RHOA, GPX1, DAG1 и USP4).

Результаты. Показана статистически значимая высокая частота метилирования генов RASSF1A, GPX1 и DAG1 в опухолевой по сравнению с таковой в гистологически нормальной ткани ($p < 0,00001$, $p = 0,0327$ и $p = 0,0374$, соответственно). Интересным является тот факт, что в группе больных без метилирования генов RASSF1A 5- и 10-летняя выживаемость составила 93,5% и 85,5%, соответственно, а с метилированием – снижалась до 80,3% и 65,3% ($p = 0,007$), соответственно.

Заключение. Метилирование генов RASSF1A, GPX1, DAG1 играет важную роль в патогенезе люминального РМЖ, изменяя функциональную активность этих генов. Метилирование генов RASSF1A ассоциируется с неблагоприятным клиническим исходом РМЖ. Эпигенетические изменения указанных генов в комбинации или отдельно каждого из них можно включать в систему биомаркеров, которые могли бы помочь в диагностике, прогнозе заболевания, и особенно для разработки индивидуальной тактики лечения РМЖ.

Ключевые слова: люминальный и нелюминальный рак молочной железы, метилирование генов, промоторная область, CpG-островки.

In the last decade it was shown that in a multistage process of tumor formation, the alterations of cellular genes can occur not only as a result of genetic events (point mutations, deletions, amplifications), but also as a result of epigenetic changes, including local DNA hypermethylation. For last period, for the identification of hypermethylated regions of DNA have been used methods, based on the differential methylation status of CpG islands in normal and tumor cells.

Aim. The aim of this study is to assess the methylation status of the tumor-associated genes group RASSF1A, RHOA, GPX1, DAG1 and USP4 in various biological subtypes of breast cancer, and also to assess their connection with the clinical course of the disease.

Methods. Methylation status analysis was performed on 174 paired samples of the tumor and the adjacent histologically unchanged tissue from the patients with breast cancer and 20 breast tissue samples from healthy women. Two independent methods were used: methylation specific PCR (for RASSF1A) and methyl sensitive restriction analysis (for RHOA, GPX1, DAG1 and USP4).

Results. A statistically significant higher frequency of methylation of the RASSF1A, GPX1 and DAG1 genes in the tumor was shown compared to that in the histologically normal tissue ($p < 0,00001$, $p = 0,0327$ and $p = 0,0374$, respectively). An interesting fact is that in the group of patients without methylation of the RASSF1A genes, 5- and 10-year survival was 93,5% and 85,5%, respectively, and with methylation it decreased to 80,3% and 65,3% ($p = 0,007$), respectively.

Conclusion. Methylation of the genes RASSF1A, GPX1, DAG1 plays an important role in the pathogenesis of luminal breast cancer, changing the functional activity of these genes. Methylation of RASSF1A genes is associated with an adverse clinical outcome of breast cancer. Epigenetic changes of these genes in combination or separately can be included in the biomarker system, which could help in the diagnosis, prognosis of the disease, and especially in the development of individual tactics for the treatment of breast cancer.

Keywords: luminal and non-luminal breast cancer, gene methylation, promoter region, CpG-island.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием (ЗНО) среди женского населения, и в мире ежегодно выявляют более 1 млн случаев первичного РМЖ. Это заболевание является одним из наиболее комплексных и гетерогенных малигнизаций и, исходя из современной молекулярно-генетической классификации, включает базовые терапевтические подтипы: люминальные и миоэпителиальные (нелюминальные), и выбор лечения зависит от экспрессии основных маркеров: рецепторов эстрогена (РЭ), прогестерона (РП), рецептора 2 человеческого эпидермального фактора роста (Her2), пролиферации Ki67. Идентификация специфически метилированных генов в разных подтипах РМЖ со схожей морфологией может привести к новым подходам в диагностике и терапии опухолевых изменений в молочной железе.

В последнее десятилетие было показано, что в многостадийном процессе образования опухолей нарушение функций ядерных генов может происходить не только в результате генетических событий (точечных мутаций, делеций, амплификаций), но и в результате эпигенетических изменений, в том числе, локального гиперметилования ДНК. В последнее время разработаны методы идентификации гиперметилованных районов ДНК, основанные на дифференциальном статусе метилирования CpG-островков в нормальных и опухолевых клетках. Изменения профиля метилирования ДНК генов-супрессоров опухолевого роста являются одним из наиболее ранних и часто встречающихся эпигенетических событий, наблюдаемых при развитии опухолей различных локализаций [1], включая рак молочной железы [2]. Такая модификация цитозинового основания в составе ДНК стимулирует неопластические процессы,

блокируя транскрипцию генов опухолевой супрессии, и отвечает за начальные этапы индукции опухолевого роста [3]. В ряде работ было показано, что на коротком плече хромосомы 3 (3p) в локусе 3p21.3 содержатся участки, которые экстремально часто подвержены мутациям, делециям и другим аномалиям [4]. В этом критичном районе идентифицировано около 20 генов, связанных с канцерогенезом, и было показано, что эпигенетические aberrации этих генов участвуют в патогенезе многих эпителиальных опухолей. Однако, данные происходили из отдельных сообщений и не изучалась их связь с разными подтипами РМЖ. В настоящей работе представлены результаты изучения эпигенетических характеристик – метилирования CpG островков промоторных регионов 5 генов (RASSF1A, USP4, GPX1, RHOA, DAG), расположенных в локусе 3p21.31 на коротком плече хромосомы 3, в опухолевом эпителии РМЖ и нормальной ткани молочной железы (табл. 1).

Цель исследования: изучить метилирование и экспрессию группы из 5 опухоль-ассоциированных генов в люминальном и миоэпителиальном РМЖ, оценить их связь с клиническим течением и прогнозом разных подтипов этого заболевания. Анализ эпигенетических модификаций в группе генов, изучаемых одновременно в тканях РМЖ, обеспечивает высокую достоверность результатов исследования.

Материал и методы

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 323 ФЗ). Молекулярно-генетические исследования проводились на образцах от 174 боль-

Функция исследованных генов – RHOA, GPX1, USP4, DAG1 и RASSF1A, локализованных в области 3p21.31

Ген	Функция
<i>RHOA (RAS homolog gene family, member A)</i> (OMIM *165390)	Принимает участие в процессах формирования актинового цитоскелета, выполняет важную роль в подвижности и адгезии клеток. Экспрессия гена ассоциируется с пролиферацией опухолевых клеток и метастазированием [5].
<i>GPX1 (glutathione peroxidase 1)</i> (OMIM*138320)	Член семейства глутатионпероксидаз, играет центральную роль в защите клеток от окислительного стресса и разрушения, участвует в стимуляции апоптоза и подавлении роста клеток [6].
<i>USP4 (Ubiquitin-specific protease 4)</i> (OMIM*603486)	Ген кодирует убиквитинспецифическую протеазу 4 типа, которая играет важную роль в широком спектре клеточных процессов, таких как протеасомная деградация, апоптоз, восстановление повреждений ДНК, регуляция клеточного цикла и иммунном ответе [7].
<i>DAG1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)</i> (OMIM*128239)	Данный ген кодирует дистрогликан белок адгезии, который состоит из 2 субъединиц – трансмембранной и внеклеточной, и осуществляет взаимосвязь внеклеточного матрикса с цитоскелетом. Описано участие данного гена в развитии, прогрессии, нарушении адгезии и метастазировании опухолей [8].
<i>RASSF1A (Ras-associated domain family 1, isoform A)</i> (OMIM*605082)	Участвует в индукции апоптоза, в регулировании клеточного цикла, в поддержании генетической стабильности [9, 10].

ных РМЖ, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все образцы подтверждены гистологически в соответствии с TNM классификацией Международного противоракового союза [11]. Из всей выборки больных РМЖ у 127 (75,6%) верифицирован люминальный подтип (включающий: люминальный А и люминальный В (Her2+ и Her2-)). Для уточнения гистологического типа и степени дифференцировки опухоли в соответствии с классификацией опухолей молочной железы ВОЗ (2013). Все образцы опухолей и нормальной неизменной ткани молочной железы (опухоль/ норма) были изучены одним патоморфологом. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование (экспрессии андрогенных рецепторов (АР), рецепторов эстрогена, прогестерона, эпидермального фактора роста 2-го типа и пролиферативной активности опухоли (индекс Ki-67)) выполнялось на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к рецепторам E ЭР α (SP1, Cell Marque), ПР (SP42, Cell Marque), АР (F39.4.1, Biogenex), Her2/neu (Herceptest, Dako) и Ki-67 (MIB1, Dako). В качестве дополнительного контроля использованы ткани молочной железы от 20 умерших женщин, не имевших в анамнезе онкологических заболеваний, в дальнейшем обозначенные как «донор».

Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани молочной железы по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при -20°C. Суммарную РНК выделяли из опухоли и гистологически неизменной ткани с помощью экстракции

смесью гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформ [12]. Водный раствор РНК хранили при температуре -40°C. Качество и концентрацию ДНК и РНК проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США). *кДНК* синтезировали с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» в соответствии с инструкцией производителя. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием набора реактивов «qPCRMix-HS SYBR» фирмы Евроген приведены в табл. 2. Учитывали случаи с изменением содержания мРНК в образцах опухолей по сравнению с образцами неизменной ткани в 3 раза и более (наиболее выраженная экспрессия).

Анализ метилирования исследуемых генов

Метилирование гена *RASSF1A* изучали с помощью ПЦР, специфичной к метилированному аллелю (метилспецифичная ПЦР, МСП). Метод МСП основан на бисульфитной конверсии ДНК, с последующей ПЦР, при этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин, и только 5-метилцитозин воспроизводится как цитозин [12]. Анализ метилирования промоторных районов генов *RHOA*, *GPX1*, *USP4* и *DAG1* проводили с применением метил-чувствительного рестриктового анализа (МЧРА). Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованную участки, содержащие 5-метилцитозин. ДНК последо-

Таблица 2.

Характеристика праймеров, условий и продуктов для количественной ПЦР в реальном времени

Название праймеров	Структура праймеров	t° отжига	Продукт ПЦР	
B2M	F: TGACTTTGTCACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	60	81	[13]
RHOA	F: CTGGTGATTGTTGGTGATGG R: GCGATCATAATCTTCCTGCC	60°C	183	[13]
GPX1	F: CCCCGGGGCCTGGTGGTGCTC R: TCGTTCCTGCGTTCTCCTGATGC	580C	68	*
USP4	F: CTACCGAGGCGTGAATAAA R: CCGCAGGGATGTTGAATAGC	580C	243	*
DAG1	F: GCACTCGAGGCGCCATTATTCAAA R: GTCGTGGTGGTGGTGGAGTCAGTT	60	226	*
RASSF1A	F: ACCTCTGTGGCGACTTCATC R: GTTCGTGTCCCGCTCCAC	600C	200	[13]

* праймеры подобраны с помощью программы Primer Select из пакета программ Lasergene7.

вательно гидролизовали с 2 метилчувствительными рестриктазами *Hpa* II (CCGG) и *Hha* I (GCGC) (Fermentas – Thermo Fisher Scientific, США) в условиях, приведенных в протоколах фирмы и использовали в качестве матрицы для ПЦР. Для амплификации применяли 2,5 мкл гидролизованной ДНК. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР взяты из ранее выполненных работ [12, 14]. *Продукты ПЦР* исследуемых и контрольных фрагментов генов разделяли одновременно путем электрофореза в 10% полиакриламидном геле.

Статистический анализ данных проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0,05. Конкордантность данных по метилированию оценивали с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Значимость корреляции по Спирмену (*R_s*) проверяли с помощью t-теста Стьюдента. Отсчет безрецидивной выживаемости определялся с помощью метода Каплана – Мейера и начинался с даты хирургического лечения, за событие принимались летальный исход без учета причины, диагностирование локорегионарного рецидива и/или отдаленных метастазов. Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных SPSS 20.

Результаты

Клинические характеристики пациентов: распределение по стадиям – табл. 3.

Медиана возраста – 54 года. Менопаузальный статус: 25 (14%) пациенток – пременопауза, 44 (26%) – менопауза, 105 (60%) – постменопауза.

Изменение статуса метилирования генов. Статус метилирования CpG-островков указанных генов изучен на выборке из 174 парных образцов опухоль/ неизменная ткань у больных РМЖ, данные по частотам метилирования представлены на рис. 1.

Как видно на рис. 1, в эпителиальных структурах РМЖ частота метилирования промоторного района гена *RASSF1A* (55/174, 31,6%) была достоверно выше частоты метилирования этого гена в парной гистологически нормальной ткани от тех же пациентов (1/174, 0,6%) ($p < 0,00001$). Профиль метилирования генов *GPX1*, *RHOA*, *USP4* и *DAG1* исследовался в 100 образцах. Метилирование CpG-островков в промоторных районах генов *GPX1* и *DAG1* в опухолевой ткани и нормальной статистически значимо различалось ($p = 0,0327$ и $p = 0,0347$, соответственно), для генов *RHOA* и *USP4* статистически значимых отличий найдено не было. Следует отметить, что в нормальной ткани

Таблица 3.

Распределение групп пациентов по стадиям

IA	IIA		IIB	
	T1N1M0	T2N0M0	T2N1M0	T3N0M0
32 пациента (18%)	45 пациенток (26%)	25 пациенток (14%)	38 пациенток (22%)	34 пациента (20%)

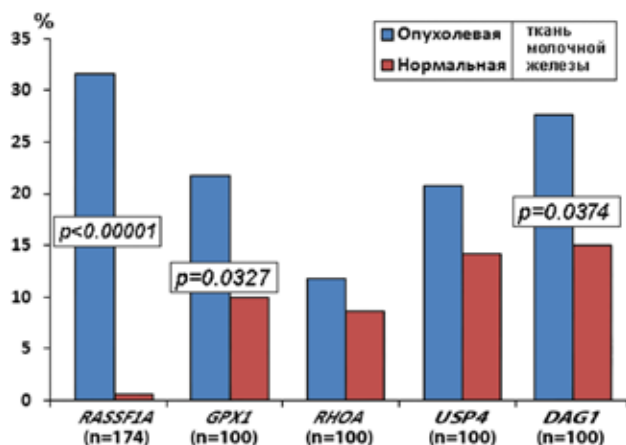


Рис. 1. Частота метилирования генов в опухоли и гистологически нормальной ткани молочных желез

молочной железы доноров уровень метилирования исследованных генов был равен нулю или немного превышал нулевой уровень. При сопоставлении этих данных с результатами мировых исследований было отмечено, что частота метилирования исследованных генов весьма близка или совпадает с данными литературы [15].

Среди 174 исследованных пациенток у 133 был диагностирован люминальный подтип РМЖ. Сравнение паттерна метилирования в люминальных и нелюминальных (миоэпителиальных) тканях РМЖ представлено на рис. 2, различия в частоте метилирования статистически не значимы.

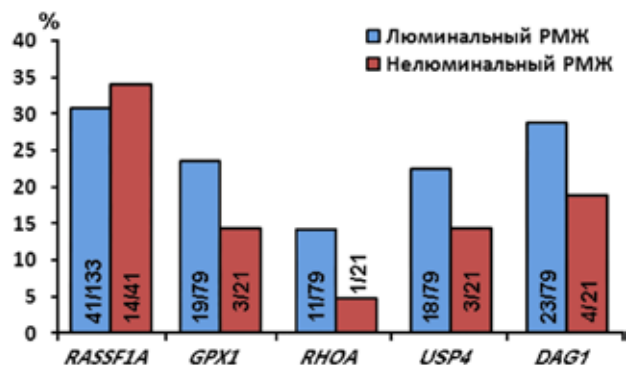


Рис. 2. Частота метилирования генов в образцах люминального и нелюминального РМЖ

Анализ частот метилирования исследованных генов в парных образцах (опухоль/ норма) тех же пациенток показал, статистически значимое различие по частоте метилирования генов RASSF1A и DAG1 в опухолевой ткани по сравнению с гистологически нормальной тканью (30,8% против 0,8%, $p<0,00001$ и 29,1% против 13,9%, $p=0,0322$, соответственно).

В настоящее время известно, что опухоль проявляет значительную пластичность во время прогрессии, особенно в регионах с различными гистопатологическими характеристиками, поэтому нами были исследованы молекулярно-генетические изменения

в люминальном РМЖ в зависимости от его подтипов. Из 133 случаев люминального РМЖ у 61 (45,9%) пациентки был установлен люминальный подтип А (включающий высокодифференцированные опухоли с наличием экспрессии РЭ (РЭ+) наличием/ отсутствием экспрессии РП (РП+/-), отсутствием гиперэкспрессии Her2). У 47 пациенток (35,3%) установлен люминальный подтип Б (иммунофенотип РЭ+, РП+, Her2neu негативный (Her2-), у 25 (18,8%) – люминальный подтип Б Her2 neu позитивный (Her2+) neu+) (рис. 3).

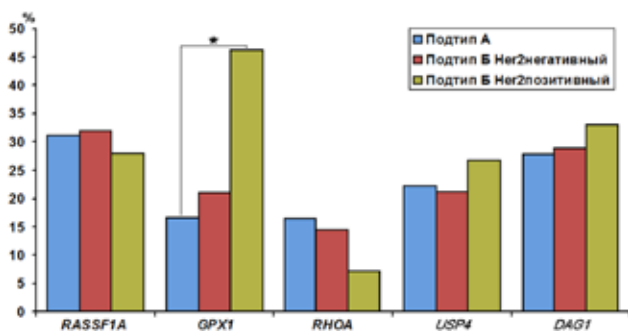


Рис. 3. Частота метилирования генов в разных подтипах люминального РМЖ.

* различия достоверны по сравнению с подтипом А при $p<0,05$

В целом сравнение уровней метилирования генов в люминальных подтипах РМЖ не выявило значительных различий для генов RASSF1A, RHOA, USP4, DAG1 и между образцами РМЖ с разной экспрессией гормональных рецепторов. Однако статистически достоверные различия в частотах метилирования были обнаружены для гена GPXI. Так, в образцах люминального подтипа А, частота метилирования для гена GPXI была в 2,8 раза ниже, чем у подтипа Б Her2-позитивного (16,7% против 46,7%). Полученные результаты указывают на связь этих генов с развитием люминального Б подтипа РМЖ, что согласуется с данными литературы [15, 16]. Все это позволяет рассматривать эти гены как молекулярные маркеры неблагоприятного прогноза РМЖ. Из данных литературы следует, что метилирование генов влияет на изменение их экспрессии в опухолевой ткани [12, 14].

В табл. 4 приведены средние величины экспрессии 5 изученных генов в зависимости от подтипа люминального РМЖ. Как видно из табл. 3 в обоих подтипах Б, по сравнению с люминальным подтипом А, выявлен повышенный уровень экспрессии генов RHOA, GPXI и USP4 хотя данные статистически не значимы. Увеличение уровня экспрессии этих генов может быть связано с их онкогенной функцией в подтипах люминального РМЖ.

Следует отметить, что ген RASSF1A показал статистически значимо более высокий уровень экспрессии при Her2-негативном люминальном подтипе Б ($p<0,05$), чем в подтипе Б Her2+ и в подтипе А. В то же время, уровень экспрессии гена DAG1 оказался

Таблица 4.

Средний уровень экспрессии генов в зависимости от подтипа люминального РМЖ

Ген	Подтип А (n=24)	Подтип Б Her2neu негативный (n=16)	Подтип Б Her2neu позитивный (n=12)
RASSF1A	2,65±4,56	188,59±355,59*§	2,55±2,56
DAG1	26,40±19,79\$+	3,22±5,27	1,29±7,73
GPX1	51,29±227,96	76,23±256,20	22,67±42,72
RHOA	52,52±212,19	92,48±257,24	122,02±302,22
USP4	18,18±24,82	42,24±122,29	52,38±129,20

* различия достоверны по сравнению с подтипом А;

§ различия достоверны по сравнению с подтипом Б Her2neu-позитивным;

+ различия достоверны по сравнению с подтипом Б Her2neu-негативным.

значимо выше в подтипе А ($p < 0,05$), чем в подтипе Б Her2- и подтипе Б Her2+. При оценке связи частоты метилирования промоторных CpG-островков изученных генов с изменением экспрессии Her2 и Ki-67, статистически значимых отличий найдено не было.

Используя данные статуса метилирования исследованных генов, выявленного у пациенток с люминальным типом РМЖ, было изучено клиническое течение заболевания. Среднее время наблюдения составило 98,75±53,36 мес. (min – max 4,1 – 208,06 мес.; медиана – 100,6 мес.). Из 127 пациенток за время наблюдения умерли 22 (17,3%), прогрессирование заболевания наблюдалось у 30 из них (23,6%). Изучение выживаемости больных с люминальным РМЖ в зависимости от статуса метилирования генов RASSF1A, USP4, DAG1, GPX1, RHOA, показало достоверно значимо высокую частоту смертности при метилировании гена RASSF1A.

Анализ смертности больных в зависимости от статуса метилирования показал, что 5- и 10-летняя выживаемость больных без метилирования RASSF1A составила 93,5% и 85,5%, соответственно, а в группе больных с метилированием этого гена, показатели выживаемости были достоверно ниже – 80,3% и 65,3% ($p = 0,007$) (рис. 4). Выявленная нами связь метилирования гена RASSF1A

с выживаемостью пациенток при люминальном РМЖ у пациенток московского региона согласуются с данными зарубежных исследователей [16].

Обсуждение

РМЖ клинически комплексное и гетерогенное заболевание с отдельными биологическими подтипами, имеющими различную этиологию и прогноз. Аккумуляция генетических и эпигенетических изменений, таких как мутации и перестройки генов, метилирование промоторных CpG-островков и др. влияет на патогенез РМЖ. Метилирование ДНК играет существенную роль в стабильности хромосом, в поддержании состояния экспрессии генов [17]. Основной задачей настоящего исследования было выявить различия в люминальных подтипах РМЖ на основе профиля метилирования группы генов и оценить их связь с клиническими особенностями и исходом заболевания. Для этой цели проведено изучение статуса метилирования локализованных на хромосоме 3p кластера генов на 174 первичных образцах РМЖ.

По данным литературы уникальный профиль метилирования промоторных CpG-островков генов существует для каждого вида рака, изменения, в которых могут быть как общими, так и специфичными для отдельных типов рака. Метилирование промоторных CpG-островков генов RASSF1A, GPX1, RHOA оценивалась разными авторами при разных видах опухолей [15, 18]. В нашем исследовании у опухолевой ткани молочной железы с разной частотой были метилированы все исследуемые гены. Однако при сравнении с нормальной (не опухолевой) тканью от тех же пациенток, уровень метилирования CpG-островков в промоторных районах генов RASSF1A, DAG1 и GPX1 был статистически значимо выше в опухоли, что указывает на их важную роль в патогенезе РМЖ. Никаких значимых различий в частоте метилирования CpG-островков в промоторных районах генов USP4, RHOA между опухолевой и нормальной тканью у пациенток не обнаружено. С одной стороны эти гены могут не играть важной роли в канцерогенезе РМЖ, но

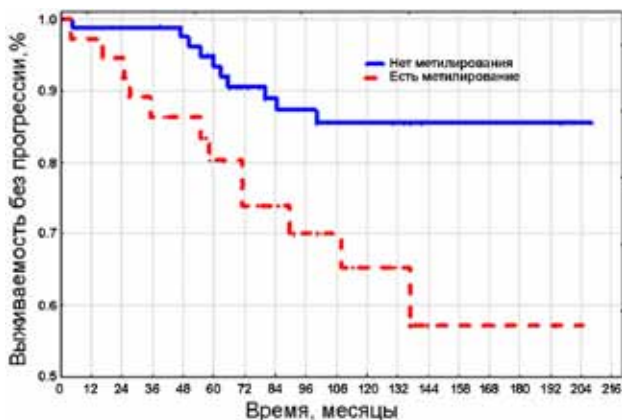


Рис. 4. Общая выживаемость больных в зависимости от метилирования RASSF1A в люминальном РМЖ

их метилирование в опухолевой и нормальной ткани может быть специфичным для РМЖ.

Мы также обнаружили, что уровень экспрессии генов *RASSF1A* и *DAG1* статистически значимо изменяется в зависимости от подтипа люминального РМЖ. Так экспрессия гена *RASSF1A* значительно повышена при Her2-негативном подтипе Б, а уровень экспрессии гена *DAG1* был снижен в группе больных как с подтипом Б Her2+, так и с подтипом Б Her2- ($p < 0,05$). Это может быть важной особенностью клинического проявления люминальных Б подтипов и одной из причин устойчивости к терапии этого подтипа РМЖ. С клинической точки зрения, выявленные эпигенетические изменения этих генов у больных с люминальным РМЖ позволили выявить достоверно значимо более низкую выживаемость пациенток, у

которых был метилирован хотя бы один из генов: *DAG1*, *RASSF1A*.

Заключение

Изучение профиля метилирования генов проведено на 174 первичных образцах РМЖ и показало, что метилирование генов *RASSF1A*, *GPX1*, *RHOA*, *USP4* и *DAG1* может играть важную роль в патогенезе этого заболевания. Было установлено, что люминальный подтип Б имеет специфический профиль метилирования и экспрессии исследованных генов. Метилирование гена *RASSF1A* ассоциируется с неблагоприятным клиническим исходом заболевания РМЖ. Эпигенетические изменения указанных генов в комбинации или отдельно каждого из них можно включать в систему биомаркеров для разработки стратегии лечения РМЖ.

Список литературы

1. Delpu Y., Cordelier P., Cho W.C., Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2013. – Vol. 14, № 7. – P. 15029–15058.
2. Pouliot M.C., Labrie Y., Diorio C., Durocher F. The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment. *Anticancer Res.* 2015. – Vol. 35, № 9. – P. 4569–4574.
3. Baylin S.B., Jones P.A. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016. – Vol. 8, № 9. – e: a019505.
4. Braga E., Loginov W., Khodyrev D. et al. A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes. *Exp Oncol.* 2011. – Vol. 33, № 1. – P. 33.
5. Zandvakili I., Lin Y., Morris J.C., Zheng Y. Rho GTPases: Anti- or pro-neoplastic targets? *Oncogene.* 2017. – Vol. 36, № 23. – P. 3213–3222.
6. Jiao Y., Wang Y., Guo S., Wang G. Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget.* 2017. – Vol. 8, № 45. – P. 80093–80102.
7. Zhong M., Jiang Q., Jin R. USP4 expression independently predicts favorable survival in lung adenocarcinoma. *IUBMB Life.* 2018. – Vol. 70, № 7. – P. 670–677.
8. Bozzi M., Morlacchi S., Bigotti M.G. et al. Functional diversity of dystroglycan. // *Matrix Biol.* 2009. – Vol. 28, № 4. – P. 179–187.
9. Kashuba V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S. et al. NotI Microarrays: Novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2012. – Vol. 13, № 10. – P. 13352–13377.
10. Donninger H., Schmidt M.L., Mezzanotte J. et al. Ras signaling through RASSF proteins. // *Semin Cell Dev Biol.* 2016. – Vol. 58. – P. 86–95.
11. Tavassoli F.A., Devilee P. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003. – [Электронный ресурс] – URL: <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb4/BB4.pdf>.
12. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenyy A.M. et al. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene.* 2016. – Vol. 576 (1 Pt 3). – P. 483–491.
13. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenyy A.M. et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene.* 2017. – Vol. 604. – P. 1–8.
14. Логинов В.И., Пронина И.В., Бурденный А.М. и др. Роль метилирования в регуляции экспрессии функционально значимых генов хромосомы 3: RHOA, GPX1, USP4, DAG1, NKIRAS1 – в опухолях молочной железы. *Молекулярная медицина.* 2014. – Т. 6. – С. 30–37.
15. Kulak M.V., Cyr A.R., Woodfield G.W. et al. Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. // *Oncogene.* 2013. – Vol. 32, № 34. – P. 4043–3051.
16. Park S.Y., Kwon H.J., Choi Y. et al. Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. // *Mod Pathol.* 2012. – Vol. 25, № 2. – P. 185–196.
17. Wong C.C., Qian Y., Yu J. Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. // *Oncogene.* 2017. – Vol. 36, № 24. – P. 3359–3374.
18. Dammann R.H., Richter A.M., Jiménez A.P. et al. Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. // *Int J Mol Sci.* 2017. – Vol. 18, № 10. – e: E2160.

References

1. *Delpu Y., Cordelier P., Cho W.C., Torrisani J.* DNA methylation and cancer diagnosis. // *Int J Mol Sci.* 2013; 14(7): 15029-15058. doi: 10.3390/ijms140715029.
2. *Pouliot M.C., Labrie Y., Diorio C., Durocher F.* The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment. *Anticancer Res.* 2015; 35(9): 4569-4574.
3. *Baylin S.B., Jones P.A.* Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; 8(9): a019505. doi: 10.1101/cshperspect.a019505.
4. *Braga E., Loginov W., Khodyrev D. et al.* A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes. *Exp Oncol.* 2011; 33(1): 33-41.
5. *Zandvakili I., Lin Y., Morris J.C., Zheng Y.* Rho GTPases: Anti- or pro-neoplastic targets? *Oncogene.* 2017; 36(23): 3213-3222. doi: 10.1038/onc.2016.473.
6. *Jiao Y., Wang Y., Guo S., Wang G.* Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget.* 2017; 8(45): 80093-80102. doi: 10.18632/oncotarget.20278.
7. *Zhong M., Jiang Q., Jin R.* USP4 expression independently predicts favorable survival in lung adenocarcinoma. *IUBMB Life.* 2018; 70(7): 670-677. doi: 10.1002/iub.1755.
8. *Bozzi M., Morlacchi S., Bigotti M.G. et al.* Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol.* 2009; 28(4): 179-187. doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.003.
9. *Kashuba V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S. et al.* NotI Microarrays: Novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(10): 13352-13377. doi: 10.3390/ijms131013352.
10. *Donninger H., Schmidt M.L., Mezzanotte J. et al.* Ras signaling through RASSF proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 58: 86-95. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.06.007.
11. *Tavassoli F.A., Devilee P. (Eds.):* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003. Available at: <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb4/BB4.pdf>.
12. *Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyi A.M. et al.* Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene.* 2016; 576(1 Pt 3): 483-491. doi: 10.1016/j.gene.2015.10.059.
13. *Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyi A.M. et al.* DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene.* 2017; 604: 1-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.
14. *Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyi A.M. et al.* The role of methylation in the regulation of expression of functionally important genes of chromosome 3: RHOA, GPX1, USP4, DAG1, NKIRAS1 – in breast tumors. *Molecular Medicine.* 2014; 6: 30-37.
15. *Kulak M.V., Cyr A.R., Woodfield G.W. et al.* Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene.* 2013; 32(34): 4043-3051. doi: 10.1038/onc.2012.400.
16. *Park S.Y., Kwon H.J., Choi Y. et al.* Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod Pathol.* 2012; 25(2): 185-196. doi: 10.1038/modpathol.2011.160.
17. *Wong C.C., Qian Y., Yu J.* Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene.* 2017; 36(24): 3359-3374. doi: 10.1038/onc.2016.485.
18. *Dammann R.H., Richter A.M., Jiménez A.P. et al.* Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10): E2160. doi: 10.3390/ijms18102160.