

Н.А. Скрябин, И.Н. Лебедев, Е.Н. Толмачева, Н.В. Чердынцева

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ РЕТИНОБЛАСТОМНОГО ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

УДК 575.23:616-006.6

Проведено исследование характера метилирования генов контроля клеточного цикла RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолевой ДНК, полученных от 40 женщин с диагнозом рак молочной железы. Аберрантное метилирование генов p14ARF и p15INK4B зарегистрировано с частотой 72% и 12% соответственно, тогда как метилирования гена RB1 отмечено не было. Высказана гипотеза, что эпигенетическая инактивация RB-зависимого пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы происходит на уровне ингибиторов циклин-зависимых киназ.

Ключевые слова: рак молочной железы, метилспецифическая ПЦР, ингибиторы циклин-зависимых киназ.

Methylation *STATus* of RB1, p14ARF, and p15INK4B cell-cycle control genes was investigated in 40 cases of breast cancer by methylation-specific polymerase chain reaction. The frequency of cancer-related gene methylation was: p14ARF (72%), p15INK4B (12%) and RB1 (0%). It is suggested that epigenetic inactivation of Rb growth-control pathway in breast cancer can be mediated on the cycline-dependent kinase inhibitors level.

Keywords: breast cancer, methylation-specific PCR, cycline-dependolent kinase inhibitors.

Введение

Злокачественные новообразования являются одной из важнейших проблем современного общества. В Сибири и на Дальнем Востоке ежегодно регистрируется около 80 000 больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования. В конце 90-х гг. (1990-2001) показатель заболеваемости вырос на 25,1%. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения региона Сибири и Дальнего Востока рак молочной железы (РМЖ) стоит на первом месте и занимает 18,8% [2]. Различные генетические нарушения являются типичной характеристикой практически всех злокачественных новообразований. Аберрантное метилирование ДНК, приводящее к инактивации транскрипции опухолесупрессорных генов, является одним из таких нарушений. Метилирование промоторных регионов генов RB1, p14ARF и p15INK4B, вовлеченных в ретинобластомный и p53-зависимый пути регуляции клеточного цикла, встречается с различной частотой при многих типах злокачественных новообразований, в том числе и при РМЖ. Однако исследования, в которых одновременно проводился анализ эпигенетического статуса нескольких

генов, участвующих в общих метаболических или регуляторных путях, являются единичными, что ограничивает представления об особенностях эпигенетической дисрегуляции генной активности при развитии опухолевого процесса.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная характеристика статуса метилирования промоторных регионов онкосупрессорных генов RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолей молочной железы, а также изучение особенностей их взаимодействия в эпигенетической инактивации RB-зависимого пути регуляции клеточного цикла.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась группа женщин, больных раком молочной железы (n=40). Проведение исследования было одобрено Комитетами по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН и НИИ онкологии СО РАМН. Клинические данные больных были получены при анализе первичных документов – историй болезни и амбулаторных карт. Больные инфильтрирующим операбельным РМЖ стадии T1-4N0-3M0-1 получали лечение в НИИ онкологии СО РАМН в 1996-2006 гг. Средний возраст больных на момент заболевания составил 50,8 лет (31-71 лет). У 18 женщин (45%) менструальный цикл был сохранен, а 22 пациентки (55%) находились в менопаузе. При гистологическом исследовании операционного материала у 39 чел. был диагностирован инфильтрирующий протоковый, у 1 женщины (2,5%) – инфильтрирующий дольковый рак. Уницентрическая форма роста опухоли отмечена у 36 женщин, тогда как у 4 пациенток (10%) наблюдался мультицентрический рост опухоли.

Образцы ДНК были выделены из операционного материала опухолей с использованием стандартной фенол-хлороформной методики. Для определения статуса метилирования онкосупрессорных генов был использован метод бисульфитной модификации ДНК с последующей метилспецифической полимеразной цепной реакцией [12]. Для проведения амплификации использовали последовательности олигонуклеотидных праймеров, специфичных метилированным и неметилированным аллелям генов [5, 9, 11]. Фрагменты ДНК фракционировали с помощью гель-электрофореза в 2,5% агарозном геле и визуализировали в проходящем свете на установке «GelDoc» («Bio-Rad», США).

Результаты и обсуждение

Аберрантное метилирование онкосупрессорных генов p14ARF и p15INK4B было зарегистрировано с частотой 72 и 12% соответственно, тогда как метилирования RB1 отмечено не было. В большинстве случаев в исследованных образцах выявлялись и метилированные и неметилированные последовательности локусов. Наличие только метилированных аллелей было зарегистрировано в гене p14ARF в 12% случаев. В 10 из 40 образцов опухолевой ткани (22,5%) промоторы всех 3 генов находились в неметилированном состоянии. По клинической характеристике данная группа не отличалась от группы больных с эпимутациями. Возраст больных с эпимутациями был от 32 до 71 года (средний возраст – 52,65 ± 1,49 лет), у больных без эпимутаций – в пределах 31-65 лет (средний возраст – 46,56 ± 3,77 лет) (p = 0,119). Среди больных с эпимутациями мультицентричные опухоли

НИИ медицинской генетики СО РАМН: **СКРЯБИН Николай Алексеевич** – аспирант, skryabinn@mail.ru; **ЛЕБЕДЕВ Игорь Николаевич** – д.б.н., зав. лаб., igor.lebedev@medgenetics.ru; **ТОЛМАЧЕВА Екатерина Николаевна** – к.б.н., н.с., kate.tolmacheva@medgenetics.ru; **ЧЕРДЫНЦЕВА Надежда Викторовна** – д.б.н., зам. директора по научной работе НИИ онкологии СО РАМН, nvch@oncology.toms.ru.

Заключение

Сравнительный анализ статуса метилирования генов RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолевой ДНК от пациенток с раком молочных желез демонстрирует высокую частоту аномального метилирования генов p14ARF и p15INK4B при нормальном эпигенетическом статусе гена RB1. Анализ литературных данных, доступных в отношении других форм рака, свидетельствует о том, что по крайней мере при лимфомах и при эпидермальном раке преимущественно наблюдается аналогичная ситуация. Не исключено, что такая комбинация эпигенотипов исследованных генов, с одной стороны, может объясняться более высокой частотой метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ, по сравнению с геном RB1, с другой – может указывать на существование особых эпигенетических механизмов дизрегуляции клеточного цикла и поддержания стабильности генома при канцерогенезе, которые запускаются уже на уровне ингибиторов циклин-зависимых киназ.

Работа выполнена в рамках интегративного проекта СО РАМН «Мо-

лекулярно-генетические механизмы формирования и прогрессии рака молочной железы: разработка критериев риска, прогноза клинического течения и чувствительности к химиотерапии на основании информативных маркеров опухоли и организма».

Литература

1. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы / Землякова В.В. [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – С. 696-703.
2. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в регионе Сибири и Дальнего Востока. Состояние онкологической службы и пути ее улучшения. / Е.Л. Чойнзонов [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 41-47.
3. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China / E.P. Xing [et al.] // Carcinogenesis. – 1999. – Vol. 20. – P. 77-84.
4. Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer. / J. Silva [et al.] // Oncogene. – 2001. – Vol. 20. – P. 4586-4590.
5. CpG island methylation STATus and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumour / P. Gonzalez-Gomez [et al.] // Brit. J. Cancer. – 2003. – Vol. 88. – P. 109-114.
6. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways / K. Murao [et al.] // Brit. J. Dermatology. – 2006. – Vol. 155. – P. 999-1005.
7. Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma. / C.C. Linda [et al.] // Int. J. Cancer. – 2006. – Vol. 119. – P. 2487-2491.
8. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15. / J.G. Hannon [et al.] // Cancer Res. – 1996. – Vol. 56. – P. 722-727.
9. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational STATus / M. Esteller [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 129-133.
10. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island / D. J. Simpson [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 1211-1216.
11. Methylation framework of cell cycle inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma / M. Roncalli [et al.] // Hepatology. – 2002. – Vol. 36. – P. 427-432.
12. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation of CpG islands / J.G. Herman [et al.] // PNAS. – 1996. – Vol. 93. – P. 9821-9826.
13. p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2 / M. Esteller [et al.] // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 2816-2821.
14. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas / K. Amara [et al.] // Ann Oncol. – 2008. – Vol. 19. – P. 1774-86.
15. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum / S.M. Dong [et al.] // Mod. Pathology. – 2005. – Vol. 18. – P. 170-178.
16. Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas / A. Yoshino [et al.] // J. Neurooncol. – 2007. – Vol. 83. – P. 153-62.
17. Promoter Hypermethylation of the RB1 Gene in Glioblastomas / M. Nakamura [et al.] // Laboratory Investigation. – 2001. – Vol. 81. – P. 77-82.

А.Р. Фарахтдинова, С.А. Федорова, Т.И. Николаева, П.М. Иванов, М.А. Бермишева, Т. Дюерк, Э.К. Хуснутдинова

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1, CHEK2, NBS1 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616-092; 575.224

Проведен скрининг у больных раком молочной железы (РМЖ) (n=60) и контрольной группы (n=120) из Республики Саха (Якутия) на наличие мутаций 5382insC, 4153delA, C61G гена BRCA1, мутаций IVS2+1G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC гена CHEK2 и 657del5 гена NBN. Данные мутации в изученной выборке не обнаружены.

Ключевые слова: рак молочной железы, мутации, популяция.

We carried out screening of patients with breast cancer (n=60) and healthy population controls (n=120) of Republic Sakha (Yakutia) on presence of mutations 5382insC, 4153delA, C61G in BRCA1 gene, mutations IVS2+1 G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC in CHEK2 gene and 657del5 in NBN gene. These mutations have not been found in the cohort.

Keywords: breast cancer, mutations, population.

Введение

В последние годы в России отмечается тенденция к росту заболевае-

ФАРАХТДИНОВА Альбина Рауфовна – аспирант Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: albina_far_81@mail.ru; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, sardaanafedorova@mail.ru; **НИКОЛАЕВА Татьяна Ивановна** – к.м.н., н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, ysc@sakha.ru; **ИВАНОВ Петр Михайлович** – д.м.н., проф., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **БЕРМИШЕВА Марина Алексеевна** – к.б.н., с.н.с. ИБГ УНЦ РАН, e-mail: marina_berm@mail.ru; **ДЮЕРК Тило** – Ганноверская медицинская школа, г. Ганновер, Германия; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., зав. отделом генетики ИБГ УНЦ РАН, ekkh@anrb.ru.

мости раком молочной железы (РМЖ). Риск возникновения заболевания в течение жизни оценивается в среднем у женщин 11%. Изучение распространения генетических маркеров предрасположенности к РМЖ в популяциях России дает необходимую информацию для скрининговых исследований, ранней диагностики и профилактики данной патологии.

Рак молочной железы в Республике Саха (Якутия) в структуре онкологической заболеваемости (19,2%) и смертности (12,8%) занимает лидирующие позиции. Стандартизованные показатели заболеваемости и смертности в 1,4 и 1,5 раза ниже российского уровня и составляют 28,5±1,2 и 11,7±1,5

на 100000 населения соответственно. Средний возраст заболевших РМЖ составил 56 лет [4].

На сегодняшний день установлено, что мутации в генах BRCA1, BRCA2, CHEK2 и NBS1 приводят к развитию РМЖ. Продукты этих генов участвуют в процессах репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, дифференцировки клеток, апоптоза (рисунок).

Анализ структурных изменений в этих генах у женщин с отягощенным семейным анамнезом может способствовать ранней диагностике заболевания.

На сегодняшний день молекулярно-генетические исследования по изучению РМЖ в Республике Саха не про-