

Роль метилирования генов микроРНК MIR-129-2, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-130b, MIR-107 и MIR-1258 в патогенезе и прогрессии рака молочной железы

Филиппова Е.А.¹, Бурдённый А.М.¹, Лукина С.С.², Пронина И.В.¹, Казубская Т.П.³, Логинов В.И.^{1,4}, Брага Э.А.^{1,4}

- ¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8
- ² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
- ³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 115478, Москва, Каширское ш., д. 23
- ⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр». 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

Согласно последним эпигеномным исследованиям, доля гиперметилируемых генов микроРНК в несколько раз выше доли белок-кодирующих генов, что делает их перспективными маркерами опухолей. **Цель исследования** – обнаружение новых генов микроРНК, изменяющих уровень метилирования при раке молочной железы, и изучение их связь с развитием заболевания. Для 5 из 6 исследованных генов микроРНК: MIR-1258, -130b, -9-1, -9-3, -129-2 – методом метилспецифичной ПЦР отмечено статистически значимое ($p < 0,01$) повышение частот метилирования в 70 образцах опухолей молочной железы в сравнении с гистологически неизменной тканью той же пациентки. Установлены значимые ($p < 0,05$) ассоциации частот метилирования 3 генов с такими параметрами прогрессии рака, как более тяжёлая стадия (III-IV) рака (MIR-9-3 и MIR-1258), низкий уровень дифференцировки (MIR-107 и MIR-1258), размер опухоли (MIR-9-3), метастазы в регионарных лимфатических узлах и отдаленные метастазы (MIR-1258). Выявленные особенности метилирования исследованных генов могут найти клиническое применение для разработки современных подходов к профилактике, прогнозированию и выбору тактики лечения РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; микроРНК; метилирование CpG-островков.

Для цитирования: Филиппова Е.А., Бурдённый А.М., Лукина С.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Роль метилирования генов микроРНК MIR-129-2, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-130b, MIR-107 и MIR-1258 в патогенезе и прогрессии рака молочной железы. *Патогенез*. 2018; 16(4): 115-118

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.115-118

Для корреспонденции: Филиппова Елена Александровна, e-mail: eafilippova93@gmail.com

Финансирование: Работа выполнена за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-315-00311 mol-a).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 26.09.2018

Role of methylation of MIR-129-2, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-130b, MIR-107, and MIR-1258 miRNA genes in the pathogenesis and progression of breast cancer

Filippova E.A.¹, Burdenny A.M.¹, Lukina S.S.², Pronina I.V.¹, Kazubskaya T.P.³, Loginov V.I.^{1,4}, Braga E.A.^{1,4}

- ¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation
- ² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation
- ³ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation
- ⁴ Medical Genetics Research Center, Moskvorechye Str. 1, Moscow 115478, Russian Federation

Epigenome studies have shown that the proportion of hypermethylated microRNA genes is several times higher than of protein-coding genes, which makes them promising markers of tumors. The aim of this study was to expand the spectrum of the miRNA genes hypermethylated in breast cancer and to investigate their connection with progression of disease. The methylation-specific PCR performed on a set of 70 breast cancer samples showed a significant increase in methylation frequency in tumor samples compared with histologically unchanged breast tissue for 5 of 6 studied microRNA genes – MIR-1258, -130b, -9-1, -9-3, and -129-2 ($p < 0.01$). Statistically significant ($p < 0.05$) associations of hypermethylation of 3 genes with parameters of cancer progression were established: for the MIR-9-3 and MIR-1258 genes - with more severe stages (III-IV) of cancer; MIR-107 and MIR-1258 - with a low level of tumor differentiation; MIR-9-3 - with tumor size; MIR-1258 - with metastases to regional lymph nodes or distant organs. The identified methylation features of the studied genes can find clinical application in development of modern approaches to prediction, prevention, and selection of tactics for the treatment of breast cancer.

Keywords: breast cancer; miRNA; methylation of CpG islands.

For citation: Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Loginov V.I., Braga E.A. [Role of methylation of MIR-129-2, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-130b, MIR-107, and MIR-1258 miRNA genes in the pathogenesis and progression of breast cancer]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 115-118 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.115-118

For correspondence: Filippova Elena Alexandrovna, e-mail: eafilippova93@gmail.com

Funding. The work was done at the expense of the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-315-00311 mol-a).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 26.09.2018

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) (С.50 по МКБ-10) – это одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований среди женщин. В мире ежегодно выявляют более 1,6 млн. случаев первичного РМЖ, только в России в 2017 г. выявлено более 70500 новых случаев этого заболевания [1]. Важную роль в патологических процессах, приводящих к развитию РМЖ, играют, по современным представлениям, и генетические, и эпигенетические факторы (регуляторные микроРНК и метилирование ДНК) [2]. Эпигеномные исследования показали, что гены микроРНК подвергаются метилированию чаще белок-кодирующих генов, что делает их перспективными биомаркерами [3]. Целью нашей работы являлось изучение вклада метилирования промоторных районов генов микроРНК (*MIR-129-2*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-130b*, *MIR-107* и *MIR-1258*) в патогенез и прогрессию рака молочной железы.

Материалы и методы исследования

Образцы опухолей РМЖ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Анализировали парные образцы опухоли и гистологически неизменной ткани молочной железы, полученные от 70 больных РМЖ, а также 17 образцов ткани молочной железы от умерших женщин без онкологических заболеваний в анамнезе. Отбор образцов проводили, как описано ранее [4]. Клинико-гистологические характеристики образцов по TNM-классификации приведены в табл. 1. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране

Таблица 1

Клинические и гистологические характеристики 70 образцов РМЖ.

Стадия	I + II	46
	III + IV	24
Степень дифференцировки	G1	6
	G2	51
	G3	13
Метастазирование	N0/M0	26
	N1-2	44
	M1	1
Размер опухоли	T1	13
	T2	43
	T3/T4	14

Примечание: G1 – высокодифференцированный РМЖ; G2 – умеренно дифференцированный РМЖ; G3 – низкодифференцированный РМЖ.

здоровья граждан», получено разрешение этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», а также информированное согласие больных.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР) проводили, как описано ранее [4]. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad Cycler T-100 (Bio-Rad, США) с использованием олигонуклеотидов и условий амплификации, описанных в работах [4-6].

Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера в программе BioStat 6.1. Изменения считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

При проведении сравнительного анализа метилирования генов *MIR-129-2*, *-9-1*, *-9-3*, *-130b*, *-107*, *-1258* на выборке из 70 парных образцов РМЖ показано статистически значимое повышение частоты метилирования 5 из них (*MIR-129-2*, *-9-1*, *MIR-9-3*, *-130b*, *-1258*) в образцах опухоли молочной железы по сравнению с парными образцами гистологически неизменной ткани (табл. 2). Для гена *MIR-107* статистически значимых изменений в частоте метилирования не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют о связи метилирования данных 5 генов с развитием рака молочной железы, что позволяет отнести их к потенциальным диагностическим маркерам РМЖ.

Полученные на репрезентативной выборке из 70 образцов РМЖ данные по частотам метилирования исследованных генов микроРНК сопоставили с клинико-гистологическими характеристиками опухолей (рис. 1).

Показана статистически значимая ($p \leq 0,05$) ассоциация повышения частоты метилирования гена *MIR-9-3* с поздней, более тяжелой (III-IV) стадией рака (рис. 1, А) и с размером опухоли (рис. 1, Г). Гиперметилирование гена *MIR-107* было статистически значимо ($p \leq 0,05$) связано с низким уровнем дифференцировки опухоли (рис. 1, Б). Промоторный CpG-островок гена *MIR-1258* чаще подвергался метилированию ($p \leq 0,05$) при более

Таблица 2

Метилирование группы генов микроРНК в 70 парных образцах РМЖ.

	Опухоль	Норма	<i>p</i>
<i>MIR-129-2</i>	29/70, 41.4%	11/70, 15.7%	0,001
<i>MIR-9-1</i>	29/70, 41.4%	12/70, 17.1%	0,003
<i>MIR-9-3</i>	28/70, 40%	9/70, 12.9%	< 0,001
<i>MIR-130b</i>	26/70, 37.1%	10/70, 14.3%	0,003
<i>MIR-107</i>	12/70, 17.1%	7/70, 10%	0,323
<i>MIR-1258</i>	23/70, 32.9%	6/70, 8.6%	< 0,001

Примечание: указаны число и процент образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован от общего количества образцов ($n = 70$). Условная норма соответствует парным образцам гистологически неизменной ткани молочной железы ($n = 70$).

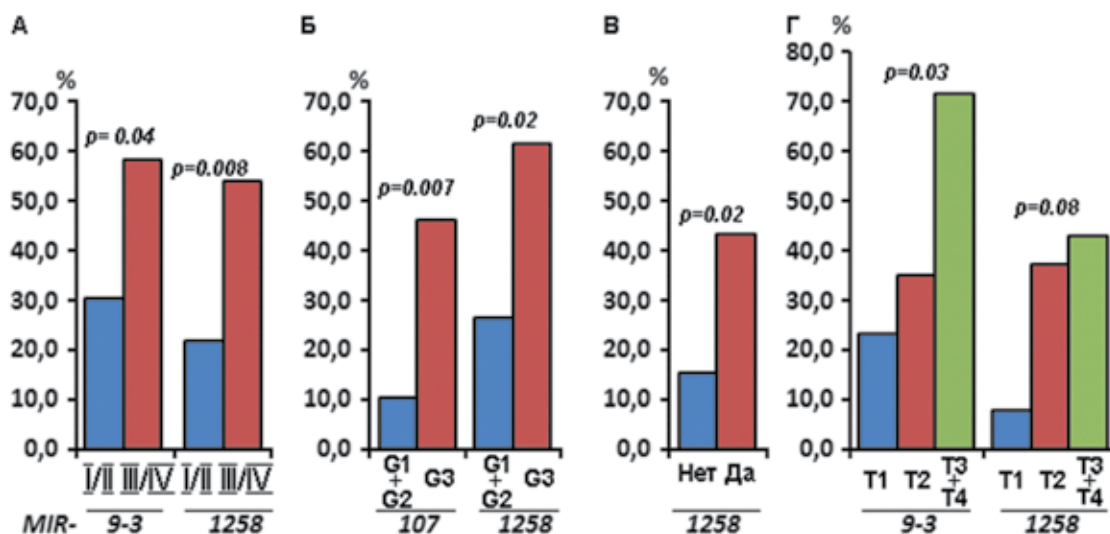


Рис. 1. Зависимость между частотой метилирования генов микроРНК (*MIR-1258*, *MIR-107*, *MIR-9-3*) и прогрессией рака молочной железы. **А** – клиническая стадия; **Б** – степень дифференцировки; **В** – метастазирование: НЕТ – группа пациенток без метастазов, Да – группа пациенток с метастазами; **Г** – размер опухоли.

тяжелой (III-IV) стадии рака (рис. 1, А), низком уровне дифференцировки опухоли (рис. 1, Б) и наличии метастазов в регионарные лимфатические узлы или отдаленные органы (рис. 1, В).

Представленные результаты по метилированию 6 генов микроРНК в злокачественных опухолях молочной железы расширяют наши предыдущие наблюдения [4] и согласуются с данными о супрессорных функциях указанных микроРНК (см. обзор [2]). Кроме того, нами показана связь повышения частоты метилирования 3 генов микроРНК (*MIR-9-3*, *MIR-107* и *MIR-1258*) с параметрами прогрессии рака молочной железы, что позволяет их рассматривать как потенциальные прогностические маркеры РМЖ.

Список литературы

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) М.: ФГБУ МНИОИ им. П.А.Герцена Минздравсоцразвития России, 2018, 250 с.
- Логинов В.И., Филиппова Е.А., Куревлев С.В., Фридман М.В., Бурденный А.М., Брага Э.А. Супрессорные и гиперметилируемые микроРНК в патогенезе рака молочной железы. *Генетика*. 2018; 54(7): 757-775. DOI: 10.1134/S0016675818070081
- Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия*. 2015; 80(2): 184-203. DOI: 10.1134/S0006297915020029
- Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хоконова В.В., Куревлев С.В., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А. Идентификация новых генов микроРНК, гиперметилованных при раке молочной железы. *Молекулярная биология*. 2016; 50(5): 797-802. DOI: 10.7868/S0026898416050104
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Dmitriev A.A., Braga E.A. 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

- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. 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

References

- Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. [Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality)] M.: FSBI Moscow in Russian P.A. Herzen Health Ministry of Russia, 2018, 250 p. (in Russian)
- Loginov V.I., Filippova E.A., Kurevlev S.V., Fridman M.V., Burdenny A.M., Braga E.A. [Suppressive and hypermethylated microRNAs in the pathogenesis of breast cancer]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2018; 54(7): 770-787. DOI: 10.1134/S1022795418070086 (in Russian)
- Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. [Methylation of miRNA genes and oncogenesis]. *Biokhimiya [Biochemistry]*. 2015; 80(2): 145-162. DOI: 10.1134/S0006297915020029 (in Russian)
- Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V., Khokonova V.V., Kurevlev S.V., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Braga E.A. [Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer]. *Molekulyarnaya biologiya [Molecular Biology]*. 2016; 50(5): 705-709. DOI: 10.1134/S0026893316050101 (in Russian)
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Dmitriev A.A., Braga E.A. 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
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. 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.

Сведения об авторах:

Филиппова Елена Александровна – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Бурденный Алексей Михайлович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Лукина Светлана Сергеевна – студентка 4 курса Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Пронина Ирина Валерьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Казубская Татьяна Павловна – доктор медицинских наук, врач-онкогенетик, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Логинов Виталий Игоревич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»

Брага Элеонора Александровна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»