

Метилирование генов *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* в эпителиальных опухолях молочной железы, яичников и при полинеоплазии

Т.П. Казубская¹, В.И. Логинов², Д.С. Ходырев², В.Д. Ермилова¹,
Ю.Г. Паяниди¹, Н.В. Чхиквадзе¹, В.Ю. Сельчук¹, Э.А. Брага²

¹ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН;

²Государственный научный центр РФ ГосНИИгенетика, Москва

Контакты: Татьяна Павловна Казубская kazubskaya@yahoo.com

Проведено изучение статуса метилирования генов-супрессоров *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* в образцах рака и гистологически нормальной ткани молочной железы и яичников. Выявлена высокая частота аномального метилирования CpG-островка генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* в опухолях молочной железы — 78% (32/41), 46% (26/56) и 35% (22/65) соответственно, в опухолях яичников — 73% (33/45), 30% (15/50), 50% (25/51). Впервые было установлено, что у 90% пациенток с первично-множественными злокачественными опухолями с поражением молочной железы и яичников имеет место гиперметилирование в CpG-островках, принадлежащих генам *RASSF1A*, *RARβ2*. Показано, что аномальное метилирование промоторной области гена *RASSF1A* можно обнаружить на доклинической стадии развития этих опухолей. Выявлена корреляция частоты метилирования промоторных районов генов *RARβ2*, *SEMA3B* с клинической стадией и степенью анаплазии рака молочной железы и яичников. Анализ метилирования генов в биологических жидкостях предполагает большие возможности использования метилирования ДНК как маркера в клинической практике.

Ключевые слова: рак молочной железы, рак яичников, первично-множественный рак, метилирование, гены *RASSF1A*, *RARβ* и *SEMA3B*

Methylation of the *RASSF1A*, *RARβ2*, and *SEMA3B* genes in epithelial breast and ovarian tumors, and in patients with polyneoplasia

T.P. Kazubskaya¹, V.I. Loginov², D.S. Khodyrev², V.D. Ermilova¹,
Yu.G. Payanidi¹, N.V. Chkhikvadze¹, V.Yu. Selchuk¹, E.A. Braga²

1N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences;

2State Research Center, State Research Institute of Genetics, Moscow

The methylation status of the tumor suppressor genes *RASSF1A*, *RARβ2*, and *SEMA3B* was studied in the samples of cancer and its histologically normal tissue of the breast and ovaries. The high rate of abnormal methylation of the CpG islet in the *RASSF1A*, *RARβ2*, and *SEMA3B* genes was found in the tumors of the breast (78% (32/41), 46% (26/56), and 35% (22/65), respectively) and ovaries 73% (33/45), 30% (15/50), and 50% (25/51). Hypermethylation in the CpG islets belonging to the *RASSF1A* and *RARβ2* genes was first ascertained in 90% of the patients with polyneoplasms involving the breast and ovaries. Abnormal methylation of the promotor region of the *RASSF1A* gene was shown to be detectable in preclinical-stage and anaplasia-degree breast and ovarian cancer. There was a correlation of the rate of methylation in the promotor regions of the *RARβ2* and *SEMA3B* genes with clinical-stage and anaplasia-degree breast and ovarian cancer. Analysis of gene methylation in biological fluids provides considerable opportunity to use methylation of DNA as a marker in clinical practice.

Key words: breast cancer, ovarian cancer, polyneoplasia, methylation, *RASSF1A*, *RARβ2*, and *SEMA3B* genes

Введение

По темпам прироста заболеваемости рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место среди других злокачественных новообразований. Ежегодная заболеваемость РМЖ в Европе составляет 109,9, а смертность — 38,5 случаев на 100 тыс. женщин в год. Рак яичников (РЯ) — 5-я по частоте причина смерти от злокачественных новообразований среди женщин и наиболее распространенная причина смерти у всех больных с опухолями женских половых органов [1]. В настоящее время реальных тестов для раннего выявления РМЖ и РЯ не существует. Известно, что мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* ассоциированы с повышенным риском развития РМЖ и РЯ и отвечают за

большинство наследственных форм этих заболеваний. Однако мутации данных генов в популяции встречаются очень редко (1 на 400 индивидов) и еще реже — в спорадических формах этих заболеваний [2, 3]. Пациентки, пораженные РМЖ и РЯ, имеют высокий риск развития второго первичного рака в парном органе и в таких органах, как толстая кишка, эндометрий, щитовидная железа, меланома кожи [4]. Выявление малигнизации молочной железы и яичников на ранней стадии развития заболевания могло бы улучшить выживаемость этих больных. На развитие РМЖ и РЯ оказывают влияние многие факторы, в том числе образ жизни, гормональные, генетические, окружающие факторы среды, и, как теперь известно, их

канцерогенез является многоступенчатым процессом, включающим различные молекулярно-генетические изменения. В настоящее время эпигенетические изменения генов играют важную роль в механизме развития этих заболеваний и рассматриваются как потенциальные маркеры канцерогенеза. Корреляция специфических эпигенетических изменений в опухоли может иметь потенциальные возможности для ранней диагностики РМЖ и РЯ и прогнозирования течения заболевания, так же как и для терапевтической стратегии.

В нормальных клетках метилирование ДНК гена встречается первоначально в его промоторном регионе, который включает CpG-островки. Обозначение CpG применяется для пар цитозин—гуанин, которые последовательно располагаются в одной и той же цепи ДНК, где цитозины предшествуют гуанинам и имеют повышенную чувствительность к метилированию. В норме метилирование CpG-островов регулирует экспрессию генов. Механизм этого процесса заключается в том, что промоторные (регуляторные) регионы генов характеризуются накоплением большого количества CpG-пар, и если они подвергаются метилированию, угнетается транскрипция этого гена [5, 6]. Гены, подвергающиеся метилированию во время ранней фазы туморогенеза, являются потенциальными маркерами ранней диагностики рака. Гены, подвергающиеся метилированию в процессе прогрессии малигнизации, служат потенциальными прогностическими маркерами [5, 6].

Цель исследования — комплексный анализ метилирования генов-супрессоров *RASSF1A* (*Ras-association domain family*), *SEMA3B* (*semaphorin 3B*), *RARβ2* (*retinoic acid receptor*) при РМЖ и РЯ, направленный на изучение роли метилирования этих генов в первичных опухолях молочной железы и яичников, а также на поиск и характеристику маркеров заболевания.

Материалы и методы

Для исследования статуса метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* использовали образцы пациентов, которые до операции не были подвергнуты лучевой или химиотерапии. Исследовались парные образцы опухолевой и прилежащей гистологически нормальной ткани 56 образцов РМЖ и 50 эпителиальных опухолей яичников. Все случаи классифицировали по TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового союза (UICC, 1998). Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводился гистологический анализ микросрезов (толщина — 5 мкм) после их окрашивания эозин-гематоксилином, что позволяло получить в исследуемом материале не менее 70 % опухолевых клеток. Образцы тканей хранили при температуре -70°C . В качестве контроля использовали лимфоциты периферической крови здоровых ин-

дивидов ($n = 15$). ДНК выделяли из ткани опухоли и из лимфоцитов крови по стандартной методике. Работа была проведена на базе Государственного научного центра РФ ГосНИИгенетика.

Анализ метилирования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и бисульфитной модификации ДНК. Метилирование генов *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* изучали с помощью ПЦР, специфичной к метилированному аллелю (метилспецифичная (МСП) ПЦР). Метод МСП основан на бисульфитной конверсии ДНК, которая достигается взаимодействием молекул гидросульфита с цитозином с превращением последнего в урацил. В дальнейшем осуществляется амплификация исследуемого фрагмента ДНК с помощью ПЦР. При этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин, и только 5-метилцитозин воспроизводится как цитозин [7].

Анализ метилирования с использованием метилчувствительных рестрикционных эндонуклеаз (метилчувствительный рестрикционный анализ — МЧРА). Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованную участки, содержащие 5-метилцитозин. ДНК последовательно гидролизовали HpaII (CCGG) HhaI (GCGC), AclI (CCGC), и Bsh1236I (CGCG) и использовали в качестве матрицы для ПЦР. Расщепление ДНК рестриктазами HhaI и HpaII проводили в буфере Y, Bsh1236I — в буфере R, AclI — в буфере NEBuffer № 3. Для амплификации применяли 2,5 мкл гидролизованной ДНК. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР приведены в табл. 1.

Статистический анализ

Конкордантность методов МСП и МЧРА оценивали статистически методом ранговой корреляции Спирмана. Достоверность коэффициента корреляции Спирмана (R_s) проверяли с помощью t-теста Стьюдента: $t = R_s / \sqrt{((1 - R_s^2) / (N - 2))}$ с числом степеней свободы $v = N - 2$, где N — размер выборки. Соответствие данных МЧРА и секвенирования, значимость повышенной частоты и плотности метилирования в опухолях по сравнению с образцами прилежащей морфологически не измененной ткани оценивали статистически с помощью ранговой корреляции Спирмана и теста Фишера.

Результаты и обсуждение

Выбор генов *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* для изучения метилирования обусловлен тем, что на коротком плече хромосомы 3 (3p21.31) выявлены критичные районы, характеризующиеся высокой плотностью

Таблица 1. Параметры маркеров, использованных при анализе метилирования промоторного района генов *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* методом МЧРА

Маркер	Структура праймеров	T _{отж} /Mg, mM [§]	Продукт ПЦР, п.н.
K1*	TGCCCTCTGGACTGGAACCT CCTGAGCCCAGCCCCAAGTC	64°C 1,5	445
K2**	AGAGTTTGATGGAGTTGGGT CATTCGGTTTGGGTCAATCC	62°C 1,5	229
RASSF1A†	GTAAAGCTGGCCTCCAGAAACACGG GCAGCTCAATGAGCTCAGGCTCCCC	65°C 2,5 [#]	357
RASSF1A-int [‡]	GGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGACGAA GGGCGGCGGGAAGGAGCTGAGGAGA	64°C 1,5	150
RAR-F1-RAR-R1	F:ATTTGAAGGTTAGCAGCCCCG	56°C	680
	R:CATTTCGGTTTGGGTCAATCC		
Rar-m-F-Rar-m-R	F:AAGTGAGTTGTTTAGAGGTAGGAGGG	63°C	280
	R:CCTATAATTAATCCAAATAATCATTTACC		
SEMA3B	TTGAGATATTGGAGTCCACGGGTG CAGTGTTGGCCTGGAAGACCTC	56°C 1,5	450
SEMA3B-int	CCTTTGCCTGCTGAGCCCCTGGAG ACCGCCCGCCGTGCCGTAAAGT	64°C 1,5	242

Примечание. *K1 — контроль полноты гидролиза ДНК, фрагмент гена β-3А-адаптина (ID Gen Bank AF247736.2, [22]); **K2 — контроль сохранности ДНК, фрагмент экзона 1 гена *RARβ2* [8]; †RASSF1A — фрагмент гена *RASSF1A*, использованный в МЧРА и при поиске HD; ‡RASSF1A-int — фрагмент гена *RASSF1A*, использованный при поиске HD; §состав буфера (кроме *): 60 мМ Трис-НCl, pH 8.5, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ KCl, 0,1% Тритон X-100, 1,5 мМ MgCl₂; #состав буфера: 67 мМ Трис-НCl, pH 8.8; 16,7 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% твин-20 [8].

и содержащие группы генов, обладающих способностью подавлять рост опухолевых клеток человека [5]. Изучение метилирования ДНК в опухолях молочной железы и яичников проводилось с использованием комбинации методов (бисульфитное секвенирование, МЧРА и МСП-ПЦР), что позволило не только более полно определить долю образцов, в которых эти гены были метилированы, но и оценить плотность метилирования CpG-островка в каждом образце.

Следует отметить, что клиническая информация для всех анализируемых групп больных не была известна до окончания изучения, которое показало, что из 59 изученных образцов РМЖ 12 принадлежали пациенткам с первично-множественными злокачественными опухолями (ПМЗО), а из 50 образцов РЯ — 5 были с ПМЗО, одной из которых являлся РЯ.

Исследован статус метилирования 18 CpG-пар в локусе гена *RASSF1A*. Данные по метилированию этого гена в 4 опухолях молочной железы и 5 опухолях яичников представлены на рис. 1, где видно, что уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных структурах РМЖ и РЯ выше, чем в гистологически нормальном эпителии тех же пациенток.

Частоты метилирования гена *RASSF1A* в опухолях и нормальной ткани достоверно отличались ($p \leq 0,005$).

Плотность метилирования CpG-пар была менее выражена, и согласно МЧРА достоверность различий по Фишеру при РМЖ составила $1,6 \times 10^{-5}$, а при РЯ — 0,22 (табл. 2). Метилирования промоторного района гена *RASSF1A* в ДНК крови 15 здоровых доноров не выявлено. В табл. 2 представлены данные метилирования гена *RASSF1A*. Согласно МЧРА плотность метилирования CpG-пар достигает 63 % (361/576) в опухоли молочной железы и 40 % (43/108) — в гистологически нормальной ткани.

Для всех исследованных опухолей установлена достоверная положительная корреляция полученных результатов методами МСП и МЧРА. Частота метилирования в опухоли молочной железы методом МЧРА была определена в 78 % (32/41), методом МСП — в 64 % (18/28) случаев против 62 % (28/45) [9]. Частота метилирования в РЯ, установленная методами МЧРА и МСП, составила 73 % (33/45) и 59 % (17/29) соответственно, что почти в 1,5 раза превышает известное значение в литературе (40 %) [10]. Полученные данные по частоте метилирования промоторного региона гена *RASSF1A* оказались близкими к наибольшим, имеющимся в литературе значениям. Однако следует отметить, что наблюдаемые различия гена *RASSF1A* могут быть связаны как с чувствительностью метода,

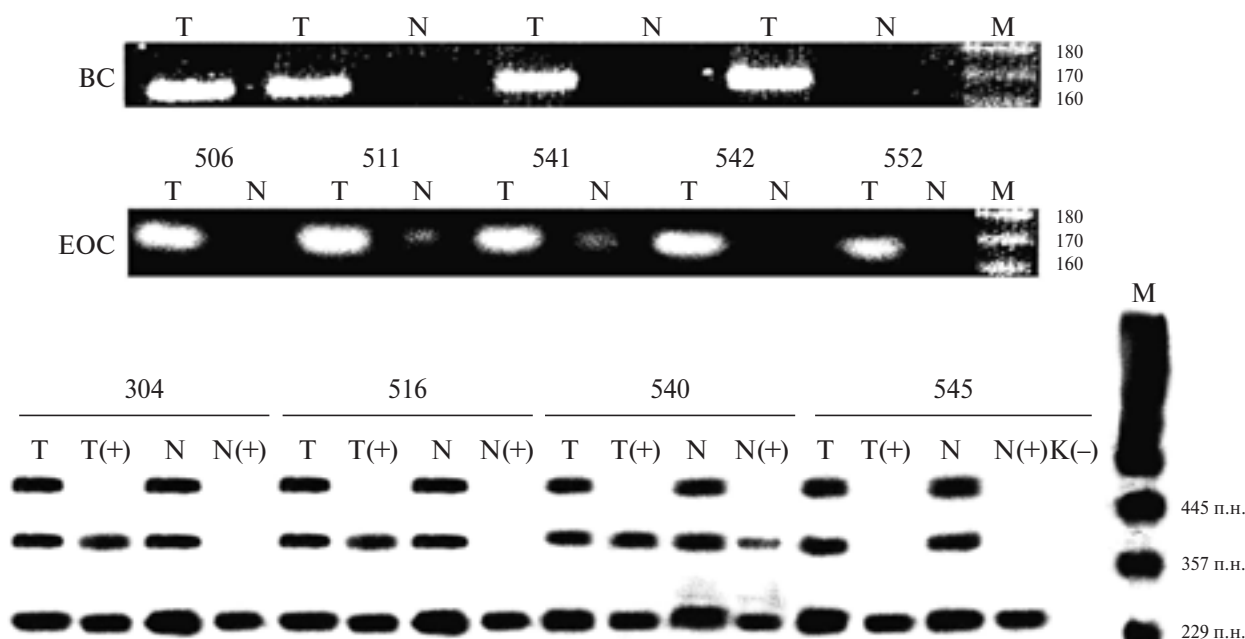


Рис. 1. Результат анализа метилирования промоторной области гена *RASSF1A* с применением метода МСП-ПЦР в образцах РМЖ и РЯ. Электрофоретическое разделение в 10% полиакриламидном геле продуктов МСП-ПЦР, полученных для образцов ДНК. ПЦР проводили на ДНК, конвертированной бисульфитом. Исследован фрагмент 168 п.н. гена *RASSF1A*. М — маркер длин фрагментов с шагом 10 п.н. (10 bp DNA ladder). Контроль полноты рестрикции — фрагмент 445 п.н., контроль целостности ДНК — фрагмент 229 п.н., анализируемый фрагмент гена *RASSF1A* — 357 п.н. К (-) — отрицательный контроль (в отсутствие ДНК). М — маркер длин фрагментов с шагом 100 п.н. (100 bp DNA ladder). Т — опухоль, N — норма

так и с этнографическими особенностями исследуемых популяций.

Примечательным является то, что нами впервые была обнаружена значительная корреляция между метилированием гена *RASSF1A* и пациентками с ПМЗО. Метилирование промоторной области гена

RASSF1A зарегистрировано у 90% (12/11) больных с ПМЗО, причем у 6 из них наблюдался билатеральный РМЖ, а у 5 — одной из первичных опухолей был РМЖ. Пациентка, у которой метилирование этого участка ДНК выявлено не было, имела 3 первичных опухоли (рак эндометрия в 40 лет, рак слепой кишки

Таблица 2. Частота и плотность метилирования промоторного района гена *RASSF1A* в РМЖ, РЯ и гистологически нормальной ткани по данным МСП и МЧРА*

Вид рака	МСП Частота метилирования**	МЧРА		
		Частота метилирования**	Плотность метилирования***	Уровень метилирования, %****
РМЖ:				
<i>p</i>	$6,39 \times 10^{-7}$	0,0051	$1,6 \times 10^{-5}$	
T	18/28; 64 %	32/41; 78 %	361/576; 63 %	49
N	0/28; 0 %	6/17; 35 %	43/108; 40 %	14
РЯ:				
<i>p</i>	$2,16 \times 10^{-6}$	$4,14 \times 10^{-6}$	0,2249	
T	17/29; 59 %	33/45; 73 %	346/594; 58 %	42
N	1/29; 3 %	2/19; 11 %	17/36; 47 %	5,2

Примечание. *Рассчитано на основании данных МЧРА и МСП (59 образцов РМЖ и 50 — РЯ). **Частота метилирования — доля образцов, в которых выявлено метилирование. ***Плотность метилирования — доля метилированных CpG-пар группы. За 100% принято произведение CpG на число образцов, в которых обнаружено метилирование. ****Уровень метилирования рассчитывали как произведение частоты метилирования на его плотность. Достоверность (*p*) рассчитана с помощью теста Фишера.

№ образца	Бисульфитное секвенирование																МЧРА		
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16				HpaII	AciI	Bsh1236I
														1, 11, 15	4, 14	5, 6			
380t																			
385t																			
518t																			
364t																			
541t																			
322t																			
363t																			
506t																			
543t																			
380n																			
518n																			
541n																			
585n																			

Рис. 2. Данные бисульфитного секвенирования и МЧРА при анализе метилирования CpG-островка промоторной области гена *RARβ2*. Черный прямоугольник — метилирование установлено, белый прямоугольник — метилирование не выявлено. Сверху позиции CpG-динуклеотидов; CpG-динуклеотиды 4, 5, 6, 11, 14 и 15, исследованные двумя методами, отмечены белым шрифтом на сером фоне; с левого края приведены номера образцов РЯ

в 49 лет и РМЖ в 50 лет.) Анализ ее родословной позволил идентифицировать синдром наследственного неполипозного колоректального рака (ННКРР) или Линча-2. Метилирование гена *RASSF1A* также обнаружено в 90 % (4/5) имеющихся образцов больных с ПМЗО, у которых одной из первичных опухолей был РЯ. Кроме того, у исследуемых пациенток, помимо высокой частоты метилирования в малигнизированном эпителии, аналогичное эпигенетическое изменение имело место в гистологически нормальной, прилежащей к опухоли ткани как молочных желез, так и яичников. Установлены четкие различия в уровнях метилирования этого участка ДНК в опухолевой и прилежащей нормальной ткани: 49 % против 14 % и 42 % против 5 % — при РМЖ и РЯ соответственно. При этом метилирование гена *RASSF1A* в нормальной ткани молочной железы выявлялось в 10 % случаев, в то время как при изучении метилирования этого гена в ДНК крови 15 здоровых пациенток было показано полное его отсутствие (0/15), что позволяет считать метилирование данного гена ранним молекулярным маркером злокачественной трансформации РМЖ и РЯ. Полученные данные согласуются с результатами работ, в которых было установлено, что характерное для опухоли метилирование ДНК обнаруживается также в морфологически нормальной, смежной с опухолью ткани, находящейся на определенном расстоянии от очага и не представляющей опухолевое микроокружение. Все это указывает на то, что характерные для опухоли эпигенетические изменения возникают раньше, чем структурные изменения ДНК [11–14].

Определение статуса метилирования промоторной области гена *RARβ* проводилось на тех же образцах

опухолей больных РМЖ и РЯ. Результаты анализа метилирования 9 образцов ДНК опухолей яичников и 4 — ДНК гистологически нормальной ткани яичников представлены на рис. 2. При сопоставлении этих данных отмечается схожесть результатов, полученных двумя независимыми методами. Методом бисульфитного секвенирования метилирование промоторной области гена *RARβ2* выявлено в 5, а методом МЧРА — в 4 из 9 образцов РЯ.

Проведенный анализ впервые показал, что частота метилирования промоторного района гена *RARβ2* со-

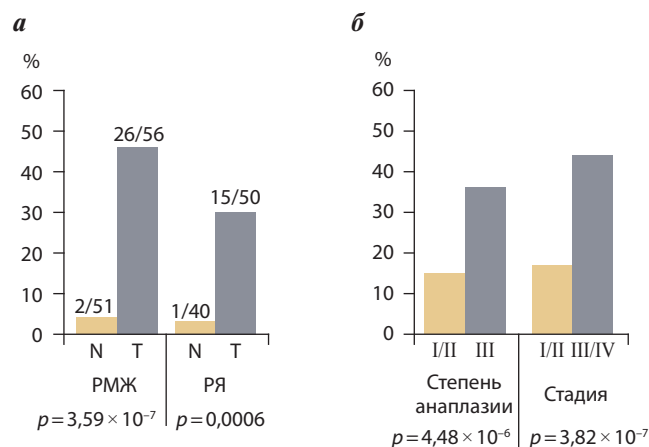


Рис. 3. Показатели уровня метилирования промоторной области гена *RARβ2* в ДНК РМЖ и РЯ: а — частота метилирования промоторного CpG-островка гена *RARβ2* в образцах ДНК первичных опухолей РМЖ и РЯ по сравнению с таковой в образцах ДНК гистологически нормальной ткани тех же пациенток; б — корреляция уровня метилирования (с учетом плотности метилирования CpG-островка) гена *RARβ2* со степенью анаплазии опухоли (I/II против III, 1-я пара столбиков) и клинической стадией РМЖ (I/II против III/IV, 2-я пара столбиков). Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера ($p \leq 0,005$)

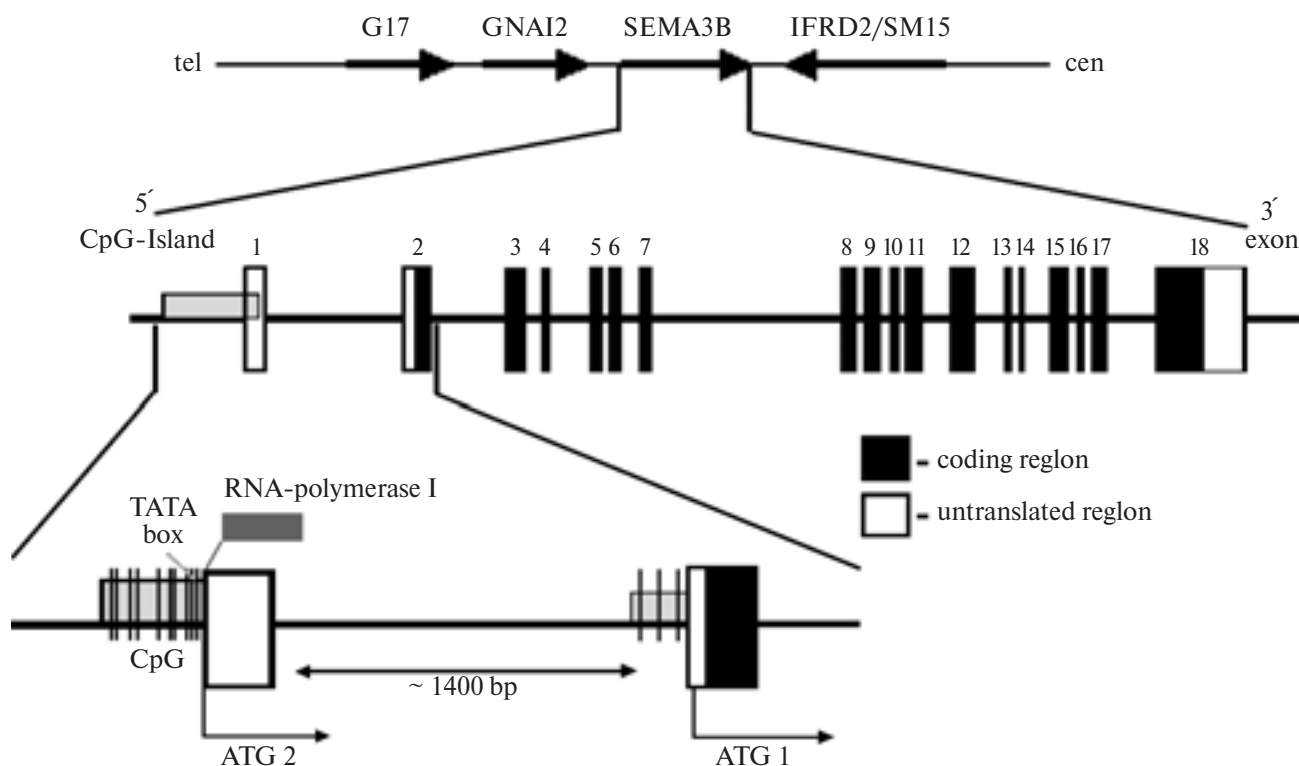


Рис. 4. Расположение и структурная организация гена *SEMA3B*. Показаны 2 CpG-островка: проксимальный — в области интрона между не-транслируемым экзоном-1 и транслируемым экзоном-2 (перед *ATG1* [15]) и дистальный — в промоторной области гена (перед *ATG2* — по базе данных NCBI, версия 36)

ставляет 46 % (26/56) при РМЖ и 30 % (15/50) — при РЯ. Частота метилирования при РМЖ достигает 46 % (26/56) и сопоставима с данными литературы (41 %) [10].

У пациенток с полинеоплазиями метилирование этого гена выявлено в 67 % (8/12) образцов ПМЗО с поражением молочной железы и в 90 % (4/5) — с поражением яичника. Метилирования гена *RARβ2* в образцах РМЖ 4 больных билатеральным РМЖ и 1 пациентки с синдромом Линча-2 не обнаружено. Показатели уровня метилирования промоторной области гена *RARβ2* в ДНК РМЖ и РЯ представлены на рис. 3.

На рис. 3а видно, что частота метилирования в ДНК опухолей молочной железы и яичников достоверно выше соответствующих величин, полученных для ДНК из морфологически нормальной ткани этих органов от тех же больных ($p \leq 0,001$). Наличие метилирования промоторной области гена *RARβ2* в некоторых образцах ДНК гистологически нормальной ткани молочной железы и яичников пациенток, выявляемое с частотой до 3–4 %, означает, что эта модификация может происходить в начале онкогенеза и предшествовать структурным изменениям в ДНК тканей больных. В ДНК из лимфоцитов крови 15 здоровых доноров с использованием 3 метилчувствительных рестриктаз не зафиксировано ни одного случая метилирования CpG-островка промоторной области гена *RARβ2*.

Исследование корреляции частоты метилирования промоторной области гена *RARβ2* с прогрессией РМЖ позволило установить, что частота метилирования этого гена увеличивалась как при более высокой степени анаплазии, так и при прогрессии опухоли (см. рис. 3б). Таким образом, уровень метилирования (с учетом плотности метилирования CpG-островка) гена *RARβ2* достоверно коррелирует с прогрессией РМЖ.

Для определения частоты метилирования промоторной области гена *SEMA3B* применялись те же образцы опухолей больных РМЖ и РЯ. Исследование продемонстрировало, что дистальный CpG-островок, расположенный в промоторной области гена *SEMA3B* перед *ATG2* (рис. 4), характеризуется высокой плотностью CpG-динуклеотидов.

Проведенный анализ показал, что согласно данным МЧРА метилирование гена *SEMA3B* выявляется в ≥ 35 % образцов ДНК РМЖ и в 50 % — РЯ. У пациенток с первично-множественным раком метилирование гена *SEMA3B* обнаружено в 33 % (4/12) образцов РМЖ (причем в 2 из этих образцов имела место делеция) и в 60 % (3/5) — РЯ (в 1 из образцов выявлена делеция), что свидетельствует о наличии аномального метилирования этого гена при ПМЗО с поражением тканей молочной железы и яичников.

В ходе изучения метилирования гена *SEMA3B* (с учетом плотности метилирования) в зависимости от

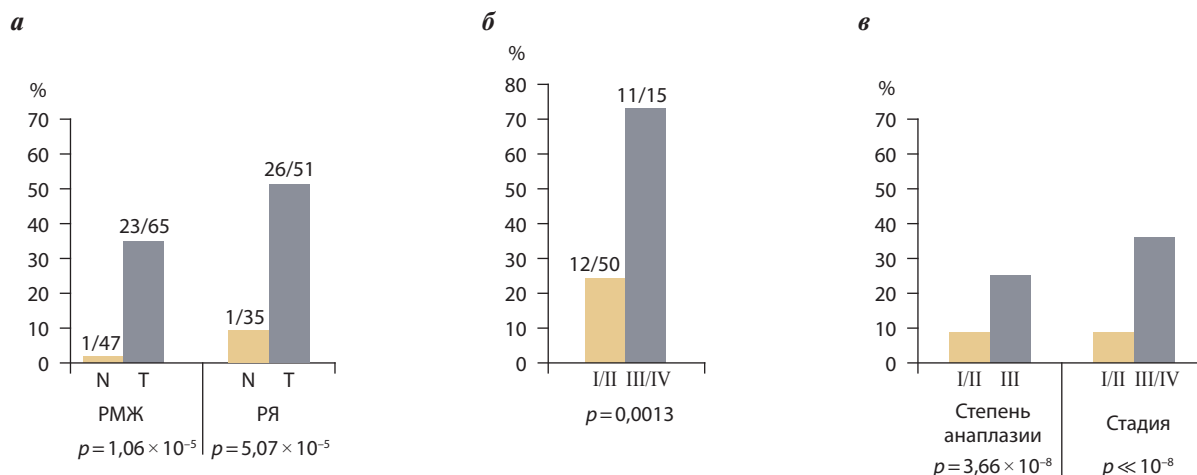


Рис. 5. Метилирование гена *SEMA3B*: а — частота метилирования дистального промоторного CpG-островка гена *SEMA3B* в образцах ДНК первичных опухолей РМЖ и РЯ в гистологически нормальной ткани; б — корреляция частоты метилирования гена *SEMA3B* с клинической стадией РМЖ; в — корреляция плотности метилирования промоторного CpG-островка гена *SEMA3B* со степенью анаплазии и клинической стадией РМЖ. Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера

клинической стадии и степени злокачественности указанных опухолей отмечена достоверная корреляция частоты метилирования с прогрессией РМЖ ($p \leq 0,03$) и степени метилирования (с учетом плотности) с прогрессией РМЖ ($p \leq 10^{-7}$) и РЯ ($p \leq 0,02$) (рис. 5).

Кроме того, установлено, что промоторная область гена *SEMA3B* достоверно чаще метилирована в ДНК опухоли, чем в ДНК соответствующей гистологически нормальной ткани той же пациентки ($p \leq 10^{-4}$ по Фишеру) (см. рис. 5а), тогда как в ДНК из лимфоцитов крови 15 здоровых доноров не выявлено ни одного случая метилирования этого участка ДНК. Полученные данные указывают на функциональное значение и специфичность метилирования промоторной области гена *SEMA3B* в онкогенезе этих опухолей.

Данные по метилированию гена *SEMA3B* ранее были получены только для рака одной локализации — легкого, причем для более проксимального CpG-островка [15]. В работе впервые выявлено метилирование не исследованного ранее дистального промоторного CpG-островка гена *SEMA3B* в опухолях молочной железы и яичников.

Заключение

При изучении статуса метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* было установлено, что эпигенетическое изменение этих генов может являться одним из последовательных молекулярных изменений при РМЖ и РЯ, а метилирование *RASSF1A* и *RARβ2* коррелирует с тенденцией к развитию ПМЗО в молочной железе и яичниках. Возможно, изменение метилирования в ДНК представляет одну из самых значимых причин появления молекулярных изменений у пациенток на пути к развитию ПМЗО. Выявленные особенности эпигенетических изменений *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* могут быть использованы как в целях ранней диагностики РМЖ (метилирование гена *RASSF1A*), так и в качестве новых прогностических тестов (метилирование генов *SEMA3B* и *RARβ2*), и позволят выделить группы риска больных по развитию РМЖ и РЯ — как солитарных, так и ПМЗО.

Анализ метилирования генов в биологических жидкостях предполагает большие возможности применения метилирования ДНК как маркера в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO). М., 2009.
2. Pharoah P.D., Antoniou A., Bobrow M. et al. Polygenic 48 susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 2002;31:33–6.
3. Narod S.A., Foulkes W.D. *BRCA1* and *BRCA2*: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004;(9):665–76.
4. Galper S., Gelman R., Recht A. et al. Second non-breast malignancies after conservative surgery and radiation therapy for early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:406–14.
5. Dammann R., Li C., Yoon J.H. et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000;25:315–9.
6. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб., 2007.
7. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acids Res* 1994;22:2990–7.
8. Ivanova T., Petrenko A., Gritsko T. et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-β2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer* 2002;2:4–11.

9. Dreijerink K., Braga E., Kuzmin I. et al. The candidate tumor suppressor gene, *RASSF1A*, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:7504–9.
10. Dammann R., Schagdarsurengin U., Seidel C. et al. The tumor suppressor *RASSF1A* in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol* 2005; 20(2):645–66.
11. Lerman M.I., Minna J.D. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res* 2000;60(21):6116–33.
12. Логинов В.И., Малюкова А.В., Серегин Ю.А. и др. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников. *Мол биол* 2004; 38:654–67.
13. Брага Э.А., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. От идентификации геномных полиморфизмов к диагностическим и прогностическим маркерам эпителиальных опухолей человека. *Мол биол* 2004;38:179–90.
14. Angeloni D. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. *Brief Funct Genom Proteom* 2007;6(1):19–39.
15. Tomizawa Y., Kohno T., Kondo H., Otsuka A. et al. Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of *RASSF1A* at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2362–8.