

АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ *SHOX2*, *TGFBR1*, *MIR-375* В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РАКА ЛЕГКИХ

Д.С. Ходырев¹, Н.С. Кулагина¹, О.И. Бровкина¹, В.Е. Покровский¹, М.Г. Гордиев²,
А.С. Келехсаева¹, А.Г. Никитин¹, А.В. Аверьянов¹

¹Федеральный научно-клинический центр специализированных видов
медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, г. Москва,
²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ», г. Казань

В 21 веке остро стоит проблема поиска эффективных и дешевых методов раннего выявления рака легких. Пациенты с подозрением на злокачественное заболевание легких, как правило, подвергаются клиническим исследованиям, таким как КТ-сканирование грудной клетки и бронхоскопия. Последнее преимущественно применяется для подтверждения диагноза. Тем не менее, даже когда признаки, симптомы и рентгенологические данные указывают на то, что клинический диагноз злокачественного заболевания легких является очевидным, требуются дополнительные инвазивные процедуры для получения биологического материала, пригодного для окончательного подтверждения наличия злокачественных клеток. В настоящее время есть четкое понимание необходимости поиска биомаркеров, способных на доклинической стадии выявлять клетки рака с помощью малоинвазивных процедур. В данной работе для образцов ДНК пациентов с различными типами рака легких, с целью лучшего понимания причин возникновения онкопатологии легких был проведен анализ метилирования генов *SHOX2*, *TGFBR1* и *MIR-375*.

Ключевые слова: рак легких, *SHOX2*, *TGFBR1*, *MIR-375*, ДНК метилирование, микроРНК.

ANALYSIS OF GENE METHYLATION *SHOX2*, *TGFBR1*, *MIR-375* IN DIFFERENT TYPES OF LUNG CANCER

D.S. Khodyrev, N.S. Kulagina, O.I. Brovkina, V.E. Pokrovsky, M.G. Gordiev,
A.S. Kelekhshaeva, A.G. Nikitin, A.V. Averyanov

In the 21st century is an acute problem to find effective and inexpensive methods for the early detection of lung cancer. Patients suspected of having a malignant disease of the lungs, generally undergo clinical studies such as CT scans of the chest and bronchoscopy. The latter is mainly used to confirm the diagnosis. However, even when the signs, symptoms and radiological findings indicate that clinical diagnosis of malignant lung disease is evident, additional invasive procedures for obtaining the biological material suitable for the final confirmation of the presence of malignant cells. Currently, there is a clear understanding of the need to find biomarkers able to detect pre-clinical stage of cancer cells using minimally invasive procedures. In this paper, for the DNA of patients with different types of lung cancer samples, with a view to a better understanding of the causes of lung cancer pathology gene methylation analysis was conducted for *SHOX2*, *TGFBR1* and *MIR-375*.

Keywords: Lung cancer, *SHOX2*, *TGFBR1*, *MIR-375*, DNA methylation, microRNA.

Введение

Метилирование ДНК является важным эпигенетическим процессом, играющим огромную роль в фундаментальных биологических собы-

тиях, таких, как развитие и дифференцировка клеток [1]. Нарушение этого процесса играет важную роль в канцерогенезе [2], а aberrантное метилирование ДНК является отличитель-

ной чертой возникновения рака у человека. [3, 4]. В настоящее время анализ метилирования ДНК является ценным источником при поиске биомаркеров рака [5]. Маркеры на основе метилирования ДНК представляют большой интерес в тех случаях, когда трудно поставить диагноз, используя обычные диагностические процедуры. Кроме того, материал для исследования маркеров метилирования может быть получен малоинвазивными способами. В то же время профили метилирования ДНК в значительной степени отличаются в различных типах раковых клеток и могут быть использованы для установления типа опухоли и определения лекарственной чувствительности.

Недавно был обнаружен ценный биомаркер, основанный на метилировании гена *SHOX2*, для выявления рака легких в бронхиальных аспиратах. [6]. Ген *SHOX2* является членом семейства гомеобоксных генов, кодирующих белки, содержащих мотив из 60-аминокислотных остатков, который представляет собой ДНК-связывающий домен. Гомеобоксные гены были широко охарактеризованы как транскрипционные регуляторы. Увеличение числа копий гена *SHOX2* было признано одним из самых распространенных и значимых хромосомных перестроек при раке легкого [7-11]. В то же время, ненормальное метилирование гена *SHOX2* является отличительной чертой раковых опухолей легких и коррелирует с увеличением числа копий участка локуса 3q25.3 [12, 13].

Метилирование гена *SHOX2* обнаруживается при злокачественной трансформации легких даже у пациентов с отрицательным результатом по цитогистологии [14, 15]. Стоит отметить, что метилирование гена *SHOX2* наблюдается в различных гистологических подтипах рака легких [12, 14-16], с особенно высокой частотой при мелкоклеточном и плоскоклеточном раке легкого [16]. Однако, в настоящее время не хватает информации о молекулярном механизме регуляции *SHOX2*.

SHOX2 действуя как транскрипционный фактор: повышает активность экспрессии трансформирующего фактора роста β -рецептора I ($T\beta R$ -I). [17]. В течение последнего десятилетия tgf - β -сигнальный путь является одним из главных путей развития рака из-за его способности регулировать клеточный рост и дифференцировку. Различные члены суперсемейства tgf - β часто мутируют при раке [18, 19]. В нормальных клетках ТФР- β действует как супрессор опу-

холи, ингибируя рост клеток, способствуя клеточной дифференцировке, и/или индуцируя апоптоз. Однако, в ходе поэтапного перехода от предраковых злокачественных клеток, ТФР- β утратил ингибирующие свойства из-за потери функциональных рецепторов и внутриклеточных мессенджеров в tgf - β -сигнальном пути [20, 21]. Предполагается, что метилирование промотора компонентов суперсемейства tgf - β является одним из основных способов инактивации ТФР- β сигнального пути [22, 23].

С другой стороны, было показано, что *SHOX2* является мишенью *mir-375* при эпителиально-мезенхимальном переходе в клетках рака молочной железы [17]. Ранее сообщалось, что метилирование микроРНК *mir-375* при немелкоклеточном раке легкого достаточно частое событие [24].

Материалы и методы

Образцы опухолей и гистологически нормальной ткани легкого от 187 пациентов (характеристики образцов даны в табл.1), которые подписали информированное согласие на проведение исследования и до операции не получавшие лучевую или химиотерапию, были собраны и клинически охарактеризованы в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Татарстан (г. Казань) в 2014-2016 гг. Опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [25, 26]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (толщина 3-5 мкм), окрашенных эозином и гематоксилином. Отбирали образцы с содержанием опухолевых клеток не менее 70%. Образцы тканей хранили при $-70^{\circ}C$.

Выделение ДНК. Геномную ДНК из легочной ткани пациентов выделяли на автоматической станции QIAcube по протоколу Blood and body fluid spin protocol V3. Контроль количества и качества ДНК осуществляли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus (GE Healthcare).

Бисульфитная конверсия. Бисульфитную конверсию ДНК осуществляли с помощью набора EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit по протоколу Quick-Start Protocol. Очистку после конверсии проводили на автоматической станции QIAcube по протоколу Cleanup of 100 ng or more bisulfite converted DNA. В качестве контро-

лей использовали геномную ДНК Jurkat (НПО «СибЭнзим») обработанную CpG-метилазой M.Sss I и геномную ДНК L-68 (НПО «СибЭнзим»).

РТ-ПЦР. Амплификацию промотерных областей исследуемых генов проводили с помощью ПЦР «в реальном времени» на термоциклере «ABI StepOnePlus» (Applied Biosystems). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ЗАО «Евроген», г. Москва, флуоресцентные зонды синтезированы ООО «ДНК-Синтез», г. Москва). Условия амплификации фрагментов ДНК: 950С/2 мин – 1-й цикл; 940С/10 сек, 58-660С/60сек – 40 циклов, условия ПЦР, последовательности праймеров, флуоресцентных зондов приведены в табл. 2.

Статистический анализ проводили с при-

менением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0.05. Расчеты проводили с помощью программы для статистического анализа данных STATISTICA 10.

Результаты и обсуждения

При изучении метилирования использовался метод RQ анализа, который позволяет провести достаточно точное сравнение уровня метилирования матрицы в каждом образце. В качестве эндогенного контроля использовался ген *COMT*. В качестве калибратора геномная ДНК Jurkat, обработанная метилтрансферазой M.SssI. Для расчета значений RQ использовалось программное обеспечение фирмы Applied Biosystems.

На рисунках 1 и 2 приведены результаты анализа метилирования для генов *SHOX2*, *Mir-375* и *TGFBR1* в образцах ткани пациентов с различ-

Таблица 1

Популяционные характеристики пациентов			
	Общее кол-во образцов	Опухоль	Условная норма*
	185 (100%)	164 (100%)	21 (100%)
Возраст			
До 50 лет	25 (16%)	25 (15%)	5 (24%)
После 50 лет	139 (84%)	139 (85%)	16 (76%)
Пол			
Мужской	104 (64%)	104 (63%)	15 (71%)
Женский	60 (36%)	60 (37%)	6 (29%)
Гистологический тип			
Аденокарцинома (АД)	-	126 (77%)	-
Плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ)	-	24 (15%)	-
Мелкоклеточный рак легкого (МРЛ)	-	14 (8%)	-
Стадия			
I	-	2 (1%)	-
II	-	159 (97%)	-
III	-	1 (1%)	-
IV	-	2 (1%)	-
Метастазы			
No	-	18 (11%)	-
Nx	-	146 (89%)	-
Метастазы			
Mo	-	156 (95%)	-
Mx	-	8 (5%)	-
Степень дифференцировки			
Низкая	-	13 (8%)	-
Умеренная	-	30 (19%)	-
Высокая	-	4 (2%)	-
н/д	-	117 (71%)	-

* Образцы гистологически нормальной ткани, прилежащей к опухоли.

Таблица 2

Последовательности праймеров, зондов и условия амплификации

Ген	Последовательность праймеров	Тотж, °С/ Размер продукта, п.о.
<i>SHOX2</i>	Прямой, CAAACCCCGATATTATACCG Обратный, TCGTGCGATTTTCGGTCCG Зонд, FAM-CGCATCCGCAAACGCCCTCG-BHQ1 Блокатор 1: ATTATACCACACAAAAACCA-P Блокатор 2: ATTTTGGTTGGGTAGGTG-P	60/132
<i>Mir-375</i>	Прямой, TCGGGATAAGTTTTAAGGC Обратный, ATCTACGACTAACACGTCG Зонд, FAM-GCGACGACCACCGCAAATACGCACCTA-BHQ1	60/160
<i>TGFBR1</i>	Прямой, AGTTATAAAGGGTCCGAGC Обратный, CGAAAACGCGAAACAACG Зонд, FAM-CCGCCGCCACCGCCTATAACCCGA-BHQ1	60/155
<i>COMT</i>	Прямой, GGGATAGTGTTATTGGTTGA Обратный, CTACCTAAACCTTATAAATAACC Зонд, FAM-TGGAATATAGGGAGGTGGTGGGA-BHQ1	60/164

ными типами рака легкого.

Как можно видеть, метилирование гена *SHOX2* является более частым событием при ПРЛ (79%) и МРЛ (71%) нежели АД (43%) (рис.1), что согласуется с данными других авторов [16]. Напротив, для гена *Mir-375* метилирование выявляется в 8% при ПРЛ, 7% при МРЛ и 6 % при АД. Сообщалось, что *Mir-375* подавляет экспрессию *SHOX2* в клетках рака молочной железы [27]. Как можно видеть на рисунке

1В, из 7 образцов, в которых обнаруживается метилирование *Mir-375*, четыре не обнаруживают метилирования *SHOX2*. Для ПРЛ и МРЛ такие случаи отсутствуют. Это может указывать на разные механизмы при возникновении онкопатологии легких.

В нормальных клетках *TGFBR1* действует как опухолевый супрессор [27]. Метилирование гена *TGFBR1* играет важную роль при возникновении таких онкопатологий как плоскоклеточный рак пищевода [28] и рак желудка [29]. Мы

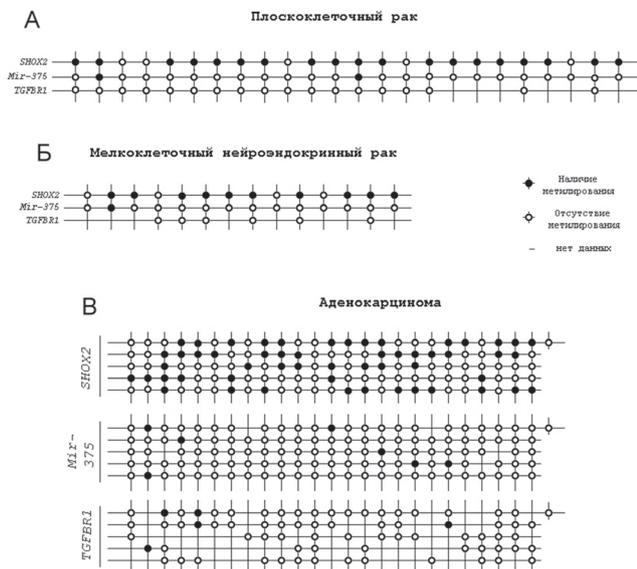


Рис. 1. Данные по метилированию для генов *SHOX2*, *Mir-375* и *TGFBR1* в образцах ткани пациентов с плоскоклеточным (А), мелкоклеточным нейроэндокринным (Б) и аденокарциномой (В) легкого.

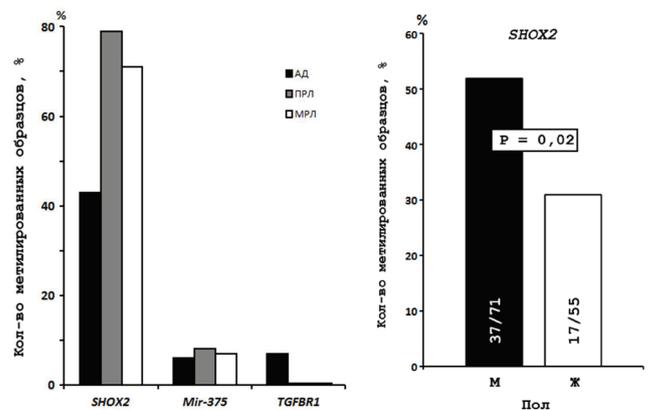


Рис. 2. Результаты анализа метилирования для генов *SHOX2*, *Mir-375* и *TGFBR1* в образцах ткани пациентов с плоскоклеточным (ПРЛ), мелкоклеточным нейроэндокринным (МРЛ) и аденокарциномой (АД) легкого.

Рис. 3. Зависимость метилирования гена *SHOX2* с полом пациентов.

показали, что метилирование *TGFBR1* при раке легкого является довольно редким событием и обнаруживается в 7% случаев только при АД. Для ПРЛ и МРЛ отсутствие метилирования может объясняться малой выборкой образцов. С другой стороны, *SHOX2* транскрипционно регулирует экспрессию *TGFBR1* [17] и частое метилирование *SHOX2* может приводить к снижению экспрессии *TGFBR1*, что дает преимущество раковым клеткам в росте. Стоит заметить, что исследуемая выборка образцов состоит преимущественно из образцов II стадии (табл.1), это может указывать на то, что снижение экспрессии *TGFBR1* является одним из ранних этапов при возникновении рака легкого. Сообщалось, что при плоскоклеточном раке пищевода метилирование гена *TGFBR1* чаще отмечалось на стадии III и IV, чем на стадии I и II [28].

Литература:

1. Robertson K.D. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610.
2. Ting A.H., McGarvey K.M., Baylin S.B. The cancer epigenome—components and functional correlates. *Genes Dev* 2006; 20: 3215-3231.
3. Shen H., Laird P.W. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013; 153: 38-55.
4. Suva` M.L., Riggi N., Bernstein B.E. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013; 339: 1567–1570.
5. Laird P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 253-266.
6. Schmidt B., Liebenberg V., Dietrich D., et. al. *SHOX2* DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer* 2010; 10: 600.
7. Qian J., Massion P.P. Role of chromosome 3q amplification in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 212-215.
8. Shen H., Gao W., Wu Y.J., et. al. Multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization reveal molecular events in lung adenocarcinomas and squamous cell lung carcinomas. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 396-403.
9. Dehan E., Ben-Dor A., Liao W., et. al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 56: 175-184.
10. Yen C.C., Liang S.C., Jong Y.J., et. al. Chromosomal aberrations of malignant pleural effusions of lung adenocarcinoma: different cytogenetic changes are correlated with genders and smoking habits. *Lung Cancer* 2007; 57: 292-301.
11. Huang Y.T., Heist R.S., Chirieac L.R., et. al. Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2660-2667.
12. Dietrich D., Hasinger O., Liebenberg V., et. al. DNA methylation of the homeobox genes *PITX2* and *SHOX2* predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol* 2012; 21: 93–104.
13. Schneider K.U., Dietrich D., Fleischhacker M., et. al. Correlation of *SHOX2* gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. *BMC Cancer* 2011; 11: 102.
14. Schmidt B., Liebenberg V., Dietrich D., et. al. *SHOX2* DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer* 2010; 10: 600.
15. Dietrich D., Kneip C., Raji O., et. al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker *SHOX2* for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int J Oncol* 2012; 40: 825–832.
16. Kneip C., Schmidt B., Seegebarth A., et. al. *SHOX2* DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1632–1638.
17. Hong S., Noh H., Teng Y., et. al. *SHOX2* Is a Direct miR-375 Target and a Novel Epithelial-to-Mesenchymal Transition Inducer in Breast Cancer Cells Neoplasia 2014; 16(4): 279–290.
18. Shelling A.N. Mutations in inhibin and activin genes associated with human disease. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 359(1–2): 113–120.
19. Akhurst R.J., Hata A. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(10): 790–811.

20. Bottinger E.P., Jakubczak J.L., Roberts I.S., et al. Expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-beta in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J.* 1997; 16(10): 2621–33.
21. Amendt C., Schirmacher P., Weber H., et al. Expression of a dominant negative type ii tgf-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene* 1998; 17(1): 25–34.
22. Ammanamanchi S., Brattain M.G. Restoration of transforming growth factor- β signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(31): 32620–32625.
23. Osada H., Tatematsu Y., Masuda A., et al. Heterogeneous transforming growth factor (TGF)- β unresponsiveness and loss of TGF- β receptor type II expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 2001; 61(22): 8331–8339.
24. Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., et al. Novel miRNA genes methylated in lung tumors. *Genetika* 2013; 49(7): 896-901.
25. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. Eds. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th ed. Wiley-Blackwell, Oxford 2009; 310 pages.
26. Travis W.D., Coby T.V., Corrin B., et al. *World Health Organization International Histological Classification of Tumours; histological typing of lung and pleural tumours.* Springer 1999.
27. Pasche B., Pennison M. J., Jimenez H., et al. *Transactions of the american clinical and climatological association* 2014; 125.
28. Dong Z., Guo W., Guo Y. et al. Concordant promoter methylation of transforming growth factor-beta receptor types I and II occurs early in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Med Sci.* 2012; 343(5): 375-381.
29. Guo W.1., Dong Z., Guo Y., et al. Concordant repression and aberrant methylation of transforming growth factor-beta signaling pathway genes occurs early in gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(10): 9453-9462.

Информация об авторах:

*Ходырев Дмитрий Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
E-mail: DmKh008@gmail.com*

*Бровкина Ольга Игоревна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России,
E-mail: brov.olia@gmail.com*

*Гордиев Марат Гордиевич, заведующий Молекулярно-диагностической лабораторией ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ»
E-mail: marat7925@gmail.com*

*Никитин Алексей Георгиевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией генетики ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
Тел.: 8 (926) 2177172
E-mail: avialn@gmail.com*

*Покровский Василий Евгеньевич – врач приемного отделения ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
E-mail: vasily.pokrovsky@gmail.com*

*Кулагина Наталья Сергеевна – врач-пульмонолог ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
E-mail: nskulagina@gmail.com*

Келехсаева Анжела Степановна – кандидат медицинских наук, врач-эндоскопист ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

*Аверьянов Александр Вячеславович – заведующий отделением пульмонологии ФНКЦ ФМБА России, руководитель Центра биомедицинских технологий, д.м.н.
Тел.: +7 (495) 395-05-11; Факс: +7 (495) 395-64-30
E-mail: averyanovav@mail.ru*