
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.21:616.006

АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАННОГО СТАТУСА ГЕНОВ: RASSF1A, BRCA1, HIN1 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ

А. А. Потапова, О. В. Островский, Г. П. Дудченко*

*Кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ВолГМУ,
Филадельфийский онкологический центр**

Некоторые гены супрессоры опухолевого роста могут быть гиперметилированными при многих новообразованиях, таких как опухоли молочной железы и яичников, но неметилированными в нормальных клетках.

С помощью бисульфитной последовательности проведен анализ метилирования следующих генов супрессоров опухолевого роста: RASSF1A, BRCA1 и HIN1. Для этого изучалась геномная ДНК из пяти различных клеточных линий опухолей молочной железы (MDA231, MDA435, MCF7, T47D, HS-578T) и яичников (A2780, SKOV3, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3), а также нормальной ткани.

Было обнаружено, что промотерные участки генов RASSF1A и HIN1 гиперметилированы в некоторых клеточных линиях обоих типов опухоли. В то же время проморенная область гена BRCA1 была неметилирована во всех исследованных клеточных линиях опухолей.

Ключевые слова: метилированный ген, неметилированный ген, RASSF1A, BRCA1, HIN1, опухоли молочной железы, опухоли яичников.

ANALYSIS OF METHYLATION STATUS ANALYSIS OF RASSF1A, BRCA1, HIN1 IN BREAST AND OVARIAN CANCER CELL LINES

A. A. Potapova, O. V. Ostrovskiy, G. P. Dudchenko

Several tumor suppressor genes have been found to be hypermethylated in many tumor types, including breast and ovarian cancer but to be unmethylated in normal cells.

Here we have examined by bisulfite sequencing the methylation status of the following tumor-suppressor genes: RASSF1A, BRCA1 and HIN1. For this study we used genomic DNA from five different breast cancer cell lines (MDA231, MDA435, MCF7, T47D, HS-578T) and five different ovarian cancer cell lines (A2780, SKOV3, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3) as well as from normal tissue.

We found promoter region of RASSF1A and HIN1 to be hypermethylated in several cancer cell lines in both types of cancer. At the same time the promoter region of BRCA1 was unmethylated in all analyzed cancer cell lines.

Key words: methylated gene, unmethylated gene, RASSF1A, BRCA1, HIN1, breast cancer, ovarian cancer.

Развитие злокачественных новообразований традиционно связывают с генетическими аномалиями в виде мутаций в генах супрессорах опухолевого роста и онкогенах или хромосомными абберациями [6]. Вместе с тем причинами данной группы заболеваний могут быть эпигенетические изменения, в результате которых меняется профиль экспрессии генов без нарушений первичной структуры ДНК [5, 7].

Одним из таких эпигенетических изменений ДНК у млекопитающих является аномально высокий уровень метилирования цитозина в позиции С5 в CpG-сочетаниях нуклеотидов промоторной зоны генов [1]. Метилирование ДНК приводит к подавлению транс-

крипции напрямую, препятствуя взаимодействию регуляторных белков (факторов транскрипции) с промотором, и опосредованно через связывание специфических репрессоров транскрипции (метилспецифических белков) с метилированной ДНК. Доказано, что степень репрессии активности гена пропорциональна плотности метилирования цитозинов на условную единицу длины ДНК.

К настоящему времени достоверно установлена роль гиперметилирования CpG-островков промоторов генов супрессоров в онкогенезе [7]. В литературе есть сведения о целом ряде генов супрессоров опухолевого роста гиперметилированных при различных видах опу-

холой [3, 4], в том числе и при опухолях молочной железы и яичников (RARb, APC, P16) [2, 3, 8, 9], но с отсутствием метилирования этих генов в нормальных тканях.

Однако не исключено, что при новообразованиях гиперметилированию могут подвергаться и другие гены супрессоры. При отсутствии специфичности эпигенетически измененных генов супрессоров по отношению к конкретным типам опухолей выявление комбинаций уже известных аномально метилированных генов супрессоров с вновь выявленными могло бы повысить диагностическую значимость таких панелей маркеров для раннего выявления новообразований определенного типа, в том числе и опухолей молочной железы и яичников.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ статуса метилирования генов супрессоров опухолевого роста RASSF1A, BRCA1, HIN1 в клеточных линиях опухолей молочной железы и яичников.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа метилированного статуса RASSF1A, BRCA1, HIN1 были использованы следующие клеточные линии: MDA231, MDA435, MCF7, T47D, HS-578T (опухолей молочной железы) и A2780, SKOV3, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3 (опухолей яичников). В качестве отрицательного контроля использовалась ДНК, выделенная из тканей молочной железы и поверхностного (внешнего) эпителия яичников, а также ДНК лимфоцитов крови здоровых людей.

Выделение ДНК проводили методом лизиса клеток при помощи протеиназы К в присутствии 10%-го раствора SDS, с последующей ее экстракцией смесью фенол/хлороформа (1:1) и преципитацией спиртом.

Оценку статуса метилирования индивидуальных CpG-островков промоторной зоны генов RASSF1A, BRCA1, HIN1 ДНК проводили, используя метод метилспецифической полимеразной цепной реакции после предварительной обработки тестируемых образцов ДНК бисульфатом натрия.

Обработка образцов ДНК бисульфатом натрия при определенных условиях приводит к дезаминированию цитозина с образованием урацила, тогда как метилированные остатки цитозина остаются неизменными. При последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР) урацил заменяется на тимин. Таким образом, оказывается возможным конструирование праймеров, избирательно амплифицирующие последовательности, содержащие или не содержащие метилированные остатки цитозина в CpG-островков.

Предварительно денатурированную 2М раствором NaOH в течение 10 минут при 37 °С геномную ДНК (1мкг/мкл) клеточных линий, нормальных лимфоцитов и тканей обрабатывали бисульфитным раствором натрия (pH 5,0) в комбинации с раствором гидрохинона с последующей инкубацией при 50 °С в течение 16—18 часов. Модифицированную ДНК очи-

щали на колонках с использованием набора Wizard DNA Clean-up System (Promega, Madison, WI), после чего для преципитации в течение 10 минут при комнатной температуре обрабатывали 3М раствором NaOH с последующим добавлением гликогена, 10М аммония ацетата и 100%-го этанола.

Амплификацию модифицированной ДНК проводили с использованием праймеров для промоторных участков генов RASSF1A, BRCA1, HIN1. Структура и ориентация праймеров представлены в табл. 1.

Визуализацию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2%-м агарозном геле при напряжении источника тока 100 В. Полосы ДНК, вырезанные из агарозного геля, очищали при помощи набора Qiagen (Gel Extraction Kit), после чего проводили секвенирование продуктов ПЦР на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems (Model 377XL) с использованием праймеров специфических для каждого гена (табл. 1).

Таблица 1

Секвенс праймеров, использованных для постановки ПЦР

| Название праймера | Секвенс праймера (5'→3') | Ориентация |
|-------------------|----------------------------|------------|
| HIN1 F | GAGGGAAGTTTTTTTTTGG (20) | Forward |
| HIN1 R | CRAAACTACAAAACAAAACCA (20) | Reverse |
| RASSF1A F | GTAGAGAGGGAGAGTGTTTTAA | Forward |
| RASSF1A R | AATCCAACCTTATCAAAAACCTAACT | Reverse |
| BRCA1 F | TYGTTYGTAGTGTTAATTATGA | Forward |
| BRCA1 R | CCRAAATAACAAAATAAACCT | Reverse |

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было обнаружено, что ген RASSF1A метилирован во всех клеточных линиях опухолей молочной железы и в 4 клеточных линиях опухолей яичников. Промоторная область гена HIN1 оказалось метилированной для 4 клеточных линий опухолей молочной железы и всех клеточных линий опухолей яичников. При исследовании промоторной области гена BRCA1 метилирование не было обнаружено ни для одной из клеточных линий. Результаты исследования приведены в табл. 2 и отражены на рис.

Секвенс ДНК нормальных тканей, клеточных линий опухолей молочной железы и яичников для генов HIN1 и RASSF1A. Не метилированный цитозин (C) заменен на урацил (T). Присутствие цитозина (C) перед гуанином (G) в CpG-динуклеотидах обозначено стрелками и показывает метилирование данного CpG-динуклеотида в клеточных линиях опухолей молочной железы и яичников, в то же время присутствие T вместо C в той же позиции в нормальных тканях, означает отсутствие метилирования.

Наличие метилирования промоторной области генов RASSF1A и HIN1 для клеточных линий карцином молочной железы и яичников позволяет рассматривать эти гены как потенциальные маркеры опухолей молочной железы и яичников.

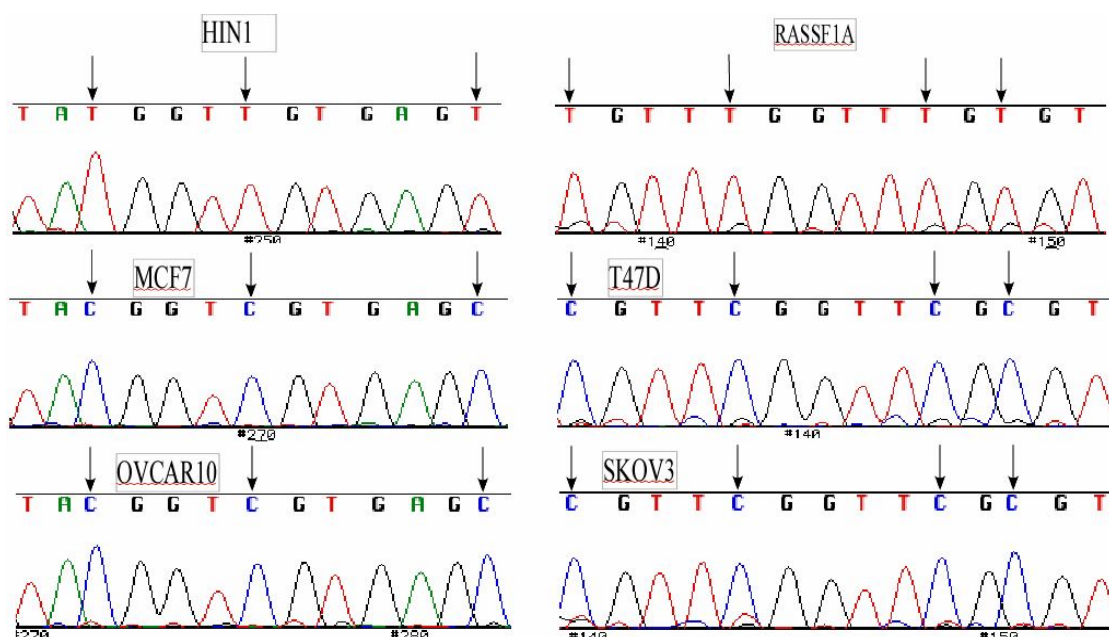


Рис. Бисульфитный секвенс промоторных областей CpG островков для генов HIN1 и RASSF1A

Таблица 2

Статус метилирования для генов: RASSF1A, BRCA1, HIN1

| Клеточные линии опухолей молочной железы | RASSF1A | HIN1 | BRCA1 |
|--|----------------|----------------|----------------|
| MDA MB 231 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| MDA MB 435 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| MCF7 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| T47D | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| HS-578T | Метилирован | Не метилирован | Не метилирован |
| Клеточные линии опухолей яичников | | | |
| OVCAR10 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| OVCAR5 | Не метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| OVCAR3 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| A2780 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |
| SKOV3 | Метилирован | Метилирован | Не метилирован |

Несмотря на то, что промоторная область гена BRCA1 оказалась не метилирована для всех проанализированных клеточных линий, это не исключает данный ген из списка потенциальных биологических маркеров опухолей молочной железы и яичников. Во-первых, установлено, что наследственная мутация гена BRCA1 значительно повышает риск возникновения опухоли молочной железы. Кроме того, этот ген имеет важную функциональную активность. BRCA1 играет центральную роль в репарации ДНК, участвует в транскрипционной регуляции гена P21, одной из функций которого является ингибирование клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК клетки. Во-вторых, по данным литературы, известны случаи гиперметилирования промоторной зоны данного гена супрессора при различных типах рака молочной железы. В то же время клеточные линии различных типов опухолей явля-

ются удобной, но не идеальной моделью анализа статуса метилирования генов, так как большинство из них представлены наиболее распространенными видами злокачественных новообразований, и по этой причине при исследовании не представляется возможным анализ всего спектра различных типов опухолей.

Таким образом, представляется интересным перспективным продолжение исследования статуса метилирования промоторных областей генов RASSF1A, HIN1 и BRCA1 в клинических образцах опухолей молочной железы и яичников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bird A. // Genes. Dev. — 2001. — № 16. — P. 6—21.
2. Dammann R., Yang G., Pfeifer G. P. // Cancer Res. — 2001. — № 61. — P. 3105—3109.
3. Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G. // Cancer Res. — 2001. — № 61. — P. 3225—3229.
4. Esteller M., Sparks A., Toyota M., et al. // Cancer Res. — 2000. — № 60. — P. 4366—4371.
5. Feinberg A. P., Tycko B. // Nature Rev. — 2004. — № 4. — P. 143—153.
6. Hanahan D., Weinberg R. A. // Cell. — 2000. — № 100. — P. 57—70.
7. Herman J. G., Baylin S. B. // N. Engl. J. Med. — 2003. — № 349. — P. 2042—2054.
8. Holst C. R., Nuovo G. J., Esteller M., et al. // Cancer Res. — 2003. — № 63. — P. 159—6601.
9. Lehmann U., Langer F., Feist H., et al. // Am J. Pathol. — 2002. — № 160. — P. 605—612.

Контактная информация

Островский Олег Владимирович — д. м. н., профессор, зав. каф. теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, e-mail: ol.ostr@gmail.com