

Метилирование генов интегринов, нидогенов и дистрогликана в норме и при раке молочной железы*

Симонова О.А.¹, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Танас А.С.^{1,3}, Руденко В.В.¹, Поддубская Е.В.⁴, Кекеева Т.В.¹, Керимов Р.А.⁴, Троценко И.Д.⁵, Алексеева Е.А.¹, Залетаев Д.В.^{1,2,3}, Стрельников В.В.^{1,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, e-mail: simonova_o.a@mail.ru

² — Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

³ — Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1, e-mail: zalnem@mail.ru

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478, Каширское ш., д.24, e-mail: podd-elena@yandex.ru

⁵ — Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки Российской Федерации, Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6, e-mail: trotsenkoivan@mail.ru

Трансмембранные клеточные рецепторы, а также компоненты внеклеточного матрикса играют фундаментальную роль в регуляции жизнедеятельности клеток и обеспечивают их согласованную интеграцию в структуры тканей. В работе изучено метилирование промоторных участков 8 генов интегринов (*ITGA1*, *ITGA2*, *ITGA3*, *ITGA4*, *ITGA6*, *ITGA7*, *ITGA9*, *ITGB1*), 2 — нидогенов и дистрогликана в нормальных тканях молочной железы (PMЖ), а также операционном материале рака молочной железы. Интегрины и дистрогликан представляют собой трансмембранные рецепторы; нидогены являются компонентами внеклеточного матрикса. Белковые продукты этих генов способны взаимодействовать с белками базальной мембраны *LAMA1*, *LAMA2* и *LAMB1*, аномальное метилирование генов которых при раке молочной железы было описано нами ранее. Частоты аномального метилирования промоторных областей генов *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA7*, *ITGA9*, *NID1* и *NID2* при раке молочной железы составили 13,3%, 29,3%, 3,3%, 40,6%, 37,3%, 39,3% соответственно. Выявлена ассоциация метилированного состояния промоторных регионов генов *ITGA4*, *ITGA9* и *NID1* с положительным статусом маркера *HER2*, маркирующим высокоагрессивную форму PMЖ.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, интегрины, нидогены, дистрогликан, метилирование ДНК, инвазия опухоли, рак молочной железы

Введение

Трансмембранные клеточные рецепторы, а также компоненты внеклеточного матрикса играют фундаментальную роль в регуляции жизнедеятельности клеток и обеспечивают их согласованную интеграцию в структуры тканей. В процессе опухолевой трансформации драматическим образом нарушается спектр сигнальной активности клеток. Подобные изменения влияют на поведение непосредственно раковой клетки и на компоненты опухолевого микроокружения. Последние, в свою очередь, могут как способствовать развитию патологического процесса, так и, наоборот, сдерживать его [8].

Ранее нами были описаны три гена субъединиц ламининов (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMB1*), промоторные области которых подвергаются аномальному метилированию при PMЖ с частотами более 16% [2]. В настоящем исследовании мы обратили внимание на гены ряда белков, способных взаимодействовать с продуктами генов *LAMA1*, *LAMA2*, *LAMB1*. К ним относятся трансмемб-

ранные рецепторы: интегрины и дистрогликан, а также компоненты внеклеточного матрикса — нидогены.

Одним из важнейших классов трансмембранных клеточных рецепторов является семейство белков интегринов. Структурно они представляют собой гетеродимеры из α - и β -субъединиц, нековалентно связанные между собой. В настоящее время известно 18 α - и 8 β -субъединиц. При взаимодействии друг с другом они образуют по меньшей мере 24 комбинации $\alpha\beta$ -рецепторов. Важнейшими функциями интегринов являются двунаправленная трансдукция сигналов и обеспечение адгезии клеток путем формирования гемидесмосом и фокальных контактов. Преобразуя внешние сигналы во внутренние, интегрины могут запускать разнообразные регуляторные каскады. Они способны влиять на такие клеточные процессы как рост, дифференцировку, адгезию, миграцию и апоптоз [1].

На сегодняшний день накопилось достаточно много информации о роли интегринов в морфогенезе и функционировании эпителия молочной железы [10]. Кроме

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01792_a.

того, изменение их экспрессии было зафиксировано при развитии РМЖ. Учитывая разнообразие функций, опосредуемых интегринами, можно предположить их вовлечение в процесс опухолевой трансформации, инвазии и метастазирования.

Дистрогликан также является клеточным поверхностным рецептором. Он состоит из двух субъединиц (α - и β -), кодирующихся единой mRNA как пропептид, который протеолитически расщепляется на две нековалентно ассоциированные субъединицы. Дистрогликан взаимодействует с разнообразными компонентами внеклеточного матрикса, такими, как ламинины, перликан и агрин. В мышечных клетках он обеспечивает физический контакт между цитоскелетом и базальной мембраной. Кроме того, дистрогликан экспрессируется в других типах клеток и участвует в эпителиальном морфогенезе, клеточной адгезии и трансдукции сигнала.

Исследование дистрогликана в ткани молочной железы свидетельствуют о его значимости в процессах поддержания клеточной полярности, архитектоники ткани и секреции ею β -казеина [30]. Кроме того, показано, что снижение экспрессии дистрогликана в клеточных линиях РМЖ ассоциировано с более агрессивным опухолевым фенотипом [22].

Важными компонентами внеклеточного матрикса является семейство белков нидогенов. Оно состоит всего из двух представителей: нидогена-1 и нидогена-2. Структурно они представляют собой сульфатированные гликопротеины размером 150 kDa, состоящие из трех глобулярных доменов. На поверхности нидогенов расположены сайты связывания с белками внеклеточного матрикса, такими, как ламинины, коллагены и интегрины. Нидогены вовлечены в морфогенез эпителия путем регуляции клеточной адгезии, поддержания целостности базальной мембраны и способны опосредованно влиять на трансдукцию сигналов [24]. Несмотря на вовлеченность нидогенов в эти процессы, на сегодняшний день очень мало известно о роли данных белков в процессах развития опухолей.

Одним из механизмов регуляции экспрессии генов может являться метилирование их промоторных областей. В настоящей работе определен характер метилирования промоторных областей генов интегринов, дистрогликана и нидогенов с целью выявления новых потенциальных маркеров канцерогенеза.

Материалы и методы

Клинический материал

Проанализировано 150 образцов РМЖ, 150 парных им образцов прилежащей морфологически неизменной ткани, шесть клеточных линий РМЖ (ZR-75-1, HBL-100, HS 578 T, BT-474, T-47D, MCF7) и шесть аутопсийных образцов нормальной молочной железы. Образцы биологического материала предоставлены ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», ФГУ МНИОИ им.

П.А. Герцена, ФГБУ МРНЦ Минздрава РФ, ФГБУ «РНЦРР» Минздрава РФ. Образцы тканей после операции замораживали и хранили в жидком азоте.

Медиана возраста женщин, больных РМЖ, и ее стандартное отклонение составили $56 \pm 11,5$ года.

Из 150 образцов 78% (117/150) представляли протоковый РМЖ, 8,6% (13/150) — дольковый, 6% (9/150) — смешанный. Микропапиллярная карцинома, слизистый, медуллярный, метапластический и низкодифференцированный типы РМЖ были представлены единичными случаями.

На момент постановки диагноза I стадию заболевания имели 12,6% (19/150), IIА — 40% (60/150), IIВ — 32% (48/150), IIIА — 6,6 (10/150), IIIВ — 6% (9/150), IIIС — 1,3% (2/150), IV — 1,3% (2/150) больных.

Согласно TNM-классификации для новообразований молочной железы, выборка была разделена на подгруппы в зависимости от размера первичной опухоли (T1 — 24,6% (37/150), T2 — 65,3% (98/150), T3 — 4,6% (7/150), T4 — 5,3% (8/150)), состояния регионарных лимфатических узлов (N0 — 48,6% (73/150), N1 — 42,6% (64/150), N2 — 8% (12/150), N3 — 0,6% (1/150)), наличия отдаленных метастазов (M0 — 98,6% (148/150), M1 — 1,3% (2/150)). Информация о состоянии рецепторов эстрогенов, прогестеронов, а также экспрессии онкобелка Her2/neu была доступна для 81 пациента.

Выделение ДНК и метилчувствительная ПЦР (МЧ-ПЦР)

Геномную ДНК выделяли с использованием стандартного метода фенол-хлороформной экстракции. Гидролиз ДНК проводили в смеси 1,5 мкг геномной ДНК, 10 ед. акт. фермента HpaII, 2 мкл буфера SEBufferY (x10) («СибЭнзим», Новосибирск). Объем смеси доводили до 20 мкл деионизированной водой и инкубировали в течение 16 ч при температуре 37°C. Основным методом исследования в данной работе явилась МЧ-ПЦР. С целью исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов МЧ-ПЦР для каждого исследуемого локуса была разработана схема ПЦР с тремя парами праймеров: один фрагмент принадлежал исследуемому гену, второй служил положительным контролем ПЦР (конститутивно метилированный участок гена *CUX1*), третий — контролем полноты гидролиза ДНК (конститутивно неметилированный участок гена *SNRK*). ПЦР проводили в смеси следующего состава: 0,1 мкг ДНК, 0,05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого dNTP, 2,5 мкл десятикратного буфера для ПЦР (50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl pH 8.4), деионизированной воды до 25 мкл. Оптимальное содержание $MgCl_2$ в ПЦР-смеси определяли экспериментальным путем для каждой пары праймеров. Реакционную смесь прогревали при 95°C в течение 5 мин и проводили 33 цикла ПЦР в следующем режиме: 95°C — 40 с, $T_{отж.}$ (табл. 1) — 40 с, 72°C — 40 с. Последнюю элонгацию проводили при 72°C в течение 10 мин. Нуклеотидные последовательности праймеров, темпера-

туры отжига, концентрации $MgCl_2$ и размеры продуктов ПЦР приведены в табл. 1. Продукты МЧ-ПЦР разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра.

Результаты

Результаты анализа метилирования промоторных областей генов интегринов, нидогенов и дистрогликана методом МЧ-ПЦР представлены в табл. 2. Полученные данные позволили выделить две категории генов: аномально метилированные при РМЖ (*ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA7*, *ITGA9*, *NID1*, *NID2*) и гены, промоторные области которых не подвергаются аномальному метилированию при РМЖ (*ITGA2*, *ITGA3*, *ITGA6*, *ITGB1*, *DAG1*).

Предварительный поиск клинико-генетических ассоциаций между состоянием метилирования генов *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA9*, *NID1*, *NID2* и клинико-морфологическими характеристиками опухолей — стадией заболевания, степенью злокачественности, типом и размером опухоли (Т), метастазами в регионарные лимфатические узлы (N) и в более отдаленные органы и ткани (M), а также иммуногистохимическим статусом рецеп-

торов эстрогена, прогестерона и HER2, — проведен путем многомерного анализа соответствий. Выявлена возможная ассоциация аномального метилирования генов *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA9*, *NID1* и *NID2* с уровнем экспрессии HER2 (рис.1).

Ассоциации метилированного состояния генов с высокой экспрессией HER2 были подтверждены с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера для генов *ITGA4*, *ITGA9* и *NID1*.

Частота метилирования гена *ITGA4* в группе HER2 «0» составляет 8/39 (20,5%), HER2 «1+» — 6/15 (40%), HER2 «2+» — 5/15 (33%), HER2 «3+» — 8/12 (67%). По данному признаку группы «1+» и «2+» обнаружили внутреннюю однородность ($p = 1$) и были объединены в общую группу «1+,2+». После чего гипотеза об отсутствии различий в группах «0», «1+,2+», «3+» была проверена критерием χ^2 , показавшим достоверное отличие ($p = 0,0109$, $\chi^2 = 9,035$, $df = 2$). Далее группы сравнивались попарно. С учетом всех попарных сравнений (6) было показано статистически значимое повышение частоты метилирования гена *ITGA4* в группе со статусом рецептора HER2 «3+» (8/12) по сравнению с группой «0» (8/39), $p = 0,0047$.

Таблица 1

Условия ПЦР и структура праймеров для анализа метилирования генов семейств интегринов, нидогенов и дистрогликана методом МЧ-ПЦР

Название гена	Нуклеотидная последовательность праймеров, 5' — 3'	Условия ПЦР		Число HpaII-сайтов	Размер продукта
		T _{отж.}	MgCl ₂ , mM		
<i>ITGA1</i>	F: ATAAGTGGCCAGCCAGAG R: GCAGGAGATGCTCAGAGAAA	62	0,3	2	184
<i>ITGA2</i>	F: CCCCTAGGCACTGTGGTTTA R: AGGCTTTCCTGCCCTGGAC	65	0,6	2	206
<i>ITGA3</i>	F: AGCAGGTGAACAGGTCCCTCA R: TACCAGGAATCGGGTATCCA	61	0,8	3	199
<i>ITGA4</i>	F: CCCCATCAGGTCCGCTCTTG R: CCCCACTCCCAGTTTCTGCC	65	2	6	246
<i>ITGA6</i>	F: CGAAGTGGCTGCGGTAG R: CAGCGAGAAGCCGAAGAG	66	0,8	5	244
<i>ITGA7</i>	F: AATGAGGAGGCCACAGAG R: CCAACGAGACTTTGGAGACC	62	0,3	3	388
<i>ITGA9</i>	F: GTTCTTCGGCTACGCAGTTC R: ACGGCGTCCCTCCTTCTC	62	0,3	3	226
<i>ITGB1</i>	F: GGGTCTGAGCACAAGCTG R: CAGTCCACTTCCCCTGTGT	61	0,8	3	100
<i>NID1</i>	F: GTCCTCCAGCTCCAGGTCCC R: CATCCCCGCTTCTCTGTC	64	2	4	205
<i>NID2</i>	F: GGAAGAGCTCGTCTGGGTGCAG R: CGCGGAGATCCAGGTTCGAG	66	2	4	210
<i>DAG1</i>	F: GCTGGATTGGCTGCAACACT R: GCAGGTGTTTCGCTCCTCCTG	65	0,6	3	226
<i>CUX1</i>	F: GCCCCGAGGACGCCGCTACC R: AGGCGGTCCAGGGTCCAGGC	61–66	0,3-2	6	565
<i>SNRK</i>	F: GCTGGGTGCGGGGTTTCGGCG R: CGGAGGCTACTGAGGCGGCGG	61–66	0,3-2	3	165

Результаты анализа метилирования промоторных областей генов интегринов, нидогенов и дистрогликана в нормальной молочной железе, в операционном материале РМЖ и в клеточных линиях РМЖ

	Метилирование в образцах опухолевой ткани молочной железы (%)	Метилирование в нормальной ткани молочной железы (%)	Наличие (+) / отсутствие (-) метилирования в клеточных линиях РМЖ					
			ZR-75-1	MCF7	T47D	BT-474	HBL-100	HS 578 T
Гены, аномально метилированные при раке молочной железы								
<i>ITGA1</i>	13,3	0	—	—	—	—	—	—
<i>ITGA4</i>	29,3	0	+	+	+	+	—	—
<i>ITGA7</i>	3,3	0	—	—	—	+	—	—
<i>ITGA9</i>	40,6	0	+	+	+	+	+	—
<i>NID1</i>	37,3	0	+	+	+	—	—	+
<i>NID2</i>	39,3	0	—	+	+	+	—	—
Гены, не подвергающиеся метилированию при раке молочной железы								
<i>ITGA2</i>	0	0	—	—	—	—	—	—
<i>ITGA3</i>	0	0	—	—	—	—	—	—
<i>ITGA6</i>	0	0	—	—	—	—	—	—
<i>ITGB1</i>	0	0	—	—	—	—	—	—
<i>DAG1</i>	0	0	—	—	—	—	—	—

Также статистически значимо увеличение частоты метилирования гена *ITGA9* в группе с положительным статусом маркера HER2 «3+» по сравнению с объединенной группой «0,1+». Частота метилирования гена *ITGA9* в группе «0» — 12/39 = 31%, «1+» — 4/15 = 27%, «2+» — 7/15 = 47%, «3+» — 9/12 = 75%. По данному признаку группы «0» и «1+» обнаружили внутреннюю однородность ($p = 1$) и были объединены в общую группу «0,1+». После чего гипотеза об отсутствии различий в группах «0,1+», «2+», «3+» была проверена критерием

χ^2 , показавшим достоверное отличие ($p = 0,012$, $\chi^2 = 8,852$, $df = 2$). Далее группы сравнивались попарно. С применением поправки Бонферрони с учетом всех попарных сравнений (6) было показано статистически значимое повышение частоты метилирования гена *ITGA9* в группе с размером опухоли «3+» (9/12) по сравнению с группой «0,1+» (16/54), $p = 0,0066$.

Частота метилирования гена *NID1* значимо выше в группе с положительным статусом маркера HER2 «3+» по сравнению с группой «0», «1+», «2+». Частота метилирования гена *NID1* в группе «0» — 11/39 = 28%, «1+» — 5/15 = 33%, «2+» — 5/15 = 33%, «3+» — 8/12 = 67%. По данному признаку группы «0», «1+», «2+» обнаружили внутреннюю однородность ($p = 0,9$) и были объединены в общую группу «0, 1+, 2+». После чего проверка гипотезы об отсутствии различий в группах «0,1+, 2+» и «3+» была проверена точным критерием Фишера, показавшим достоверное отличие ($p = 0,0229$).

Гены *ITGA1* и *NID2* демонстрируют увеличение частоты метилирования с увеличением экспрессии HER2. Однако зависимость не достигает статистически значимого уровня.

Обсуждение результатов

Согласованная интеграция морфогенетических сигналов и обеспечение надлежащей клеточной адгезии/миграции являются фундаментальными основами сохранения и поддержания тканевой структуры клетками. Механизмы регуляции могут реализовываться посредством лиганд-рецепторного взаимодействия клетки

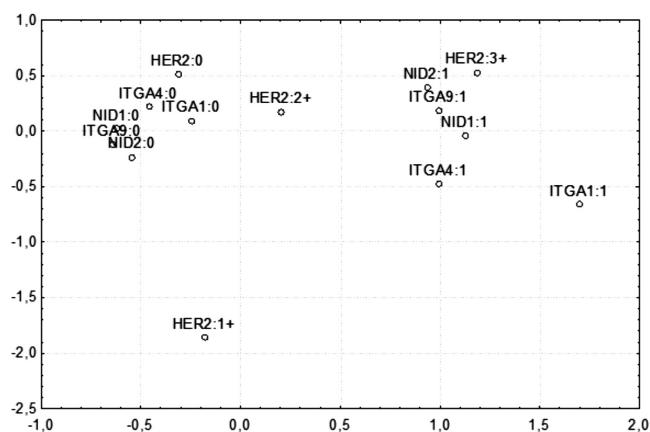


Рис. 1. Многомерный анализ соответствий для пространства генов *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA9*, *NID1*, *NID2* и уровня экспрессии белка HER2. Состояние метилирования генов обозначено цифрами: 0 — неметилированное, 1 — метилированное. Показана ассоциация метилированного состояния генов с высокой экспрессией HER2.

с окружающими ее компонентами. Взаимодействие ламининов, интегринов и дистрогликана является критически важным для функционирования эпителиальных клеток молочной железы (рис. 2).

В предыдущей работе нами были описаны три гена субъединиц ламининов (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMB1*), промоторные области которых подвергаются аномальному метилированию при раке молочной железы с частотой более 16% [2]. В настоящем исследовании мы обратили внимание на гены ряда белков, способных взаимодействовать с продуктами *LAMA1*, *LAMA2*, *LAMB1*.

Интегрины — один из важнейших классов трансмембранных рецепторов. Они выполняют широкий спектр функций: от обеспечения адгезии путем формирования гемидесмосом и фокальных контактов до трансдукции сигналов, регулирующих жизнедеятельность клетки. На сегодняшний день известно, что мутации в генах субъединиц интегринов могут приводить к развитию ряда аутосомно-рецессивных заболеваний: тромбастении Гланцмана, недостаточности адгезии лейкоцитов и буллезному эпидермолизу [29]. Кроме того, изменение экспрессии интегринов и сигнальной трансдукции было зафиксировано в различных типах опухолей, что, очевидно, может вносить вклад в развитие патологического процесса. Нами был исследован статус метилирования восьми промоторных областей генов интегринов в норме и при РМЖ. Было выявлено, что аномальному метилированию при РМЖ могут подвергаться гены *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA7* и *ITGA9*.

Высокая частота аномального метилирования при РМЖ (29,3%) выявлена в промоторе гена *ITGA4*. Продукт данного гена входит в состав двух интегринов — $\alpha4\beta1$ и $\alpha4\beta7$ — и на текущий момент о нем известно достаточно много. К сожалению, несмотря на большое разнообразие работ, невозможно говорить о едином мнении относительно роли интегрин $\alpha4$ в опухолеобразовании. Так, было показано, что он может выступать в качестве опухолевого супрессора, и его экспрессия коррелирует со степенью трансформации опухолевых клеток и наличием метастазов [6]. В недавнем исследовании выявлено наличие аномального метилирования гена *ITGA4* в 41% случаев РМЖ и его ассоциация с HER2-положительным иммуногистохимическим статусом, а также с низкой степенью дифференцировки опухолей [7]. Кроме того, аномальное метилирование этого гена было выявлено при раке простаты [14], холангиокарциноме [27], а также в опухолях желудка [23] и пищевода [17]. Использование деметилирующих агентов, таких, как 5-Aza-dC, приводило к восстановлению экспрессии интегрин $\alpha4$, что указывает на роль метилирования в регуляции соответствующего гена. Экспрессия интегрин $\alpha4$ может подавлять метастазирование лимфомы и меланомы [11, 25]. В ряде исследований показано, что интегрины $\alpha4\beta1$ и $\alpha4\beta7$ экспрессируются в лимфоме, меланоме и вовлечены в опухолевую транс-

формацию и метастазирование [6, 15]. Интегрин $\alpha4\beta1$ может способствовать адгезии клеток меланомы к эндотелию сосудов [26]. Возможно, повышенная экспрессия гена *ITGA4* может, с одной стороны, подавлять отделение и инвазию опухолевых клеток, способствуя, с другой стороны, их диссеминации посредством усиления взаимодействия с поверхностными лигандами эндотелиальных клеток [5].

Нами обнаружена высокая частота (40,6%) аномального метилирования гена *ITGA9* в тканях РМЖ. Продукт данного гена входит в состав интегрин $\alpha9\beta1$, который способен взаимодействовать со множеством молекул, таких, как: тромбоспондин-1, ADAM12/ADAN15, фактор роста нервов, VCAM1, фибронектин, тенасцин С, остеопонтин, а также VEGF-C и D [21]. Экспрессия гена *ITGA9* необходима для обеспечения жизнедеятельности организма: мыши, у которых ген инактивирован, погибают на 6—12 день эмбрионального развития. Интегрин $\alpha9\beta1$ участвует в регуляции таких фундаментальных клеточных процессов, как адгезия, миграция, дифференцировка и пролиферация. Существует большое число работ, посвященных изучению роли интегрин $\alpha9$ в процессах канцерогенеза. Было показано, что активация его экспрессии наблюдается в медуллобластоме [9], астроцитоме и глиобластоме [4]. С другой стороны, исследование генетических и эпигенетических изменений в гене *ITGA9* (методом NotI-microarray) выявило частые (>30%) изменения (делетии, метилирование) при раке почек, легких, молочной железы, яичников, шейки матки, а также опухолях прямой кишки. В опухолях

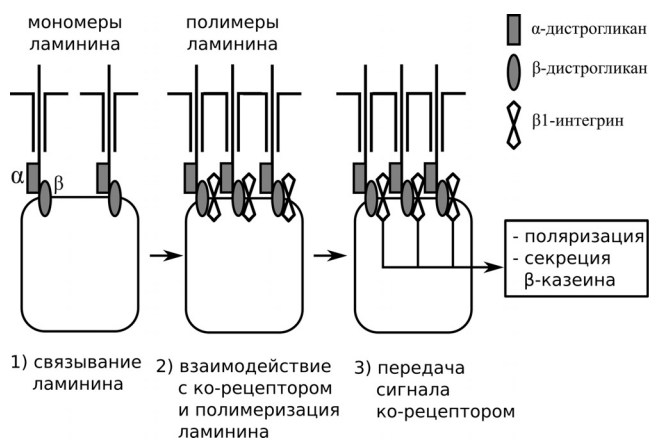


Рис. 2. Роль дистрогликана в процессе трансдукции сигнала ламинином-111:

1) α -дистрогликан на поверхности эпителиальной клетки молочной железы связывает мономеры ламинина-111; 2) комплекс ламинин/дистрогликан взаимодействует с ко-рецептором, $\beta1$ -интегрином, что приводит к полимеризации ламинина-111; 3) последующая активация ко-рецептора ведет к внутриклеточной передаче сигнала. Следствием этого является поляризация клеток и секреция ими β -казеина [30].

молочной железы экспрессия гена *ITGA9* была снижена или же полностью отсутствовала в 44% образцов, тогда как в 45% случаев она была не изменена или повышена. При этом метилирование промоторной области гена *ITGA9* в первой группе опухолей составило 90%. Обработка *ITGA9*-негативных клеток линии MCF7 деметилирующим агентом 5-aza-dC восстанавливала экспрессию интегрина $\alpha 9$ [21]. При изучении карциномы шейки матки делеции в гене *ITGA9* были выявлены в 41% случаев, а частота аномального метилирования промоторной области составила 24% [19]. Важно также отметить, что ген *ITGA9* входит в состав так называемого региона AP20 на хромосоме 3p21.3. Этот регион является «горячей точкой» гомозиготных делеций в опухолях почек, легких, карциномах молочной железы и вовлечен в малигнизацию множества типов эпителия [18]. Помимо делеций, для данного региона описано протяженное изменение характера метилирования и модификации хроматина при опухолях прямой кишки [12]. Интересным является наблюдение большой родословной с синдромом Линча, члены которой были подвержены разнообразным типам рака: эндометрия, прямой кишки, печени, желудка, молочной железы, головного мозга, лейкемии и др. При молекулярном исследовании была выявлена протяженная делеция 400 т.п.н., включающая гены *LRRFIP2*, *GOLGA4* и *C3orf35/APRG1*, продукты которых играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Результатом этой делеции явилось образование химерного гена, включающего с 1 по 11 экзоны гена *MLH1* и 17–28 экзоны гена *ITGA9*. Предполагается, что трансмембранный и цитоплазматический домены 3'-конца *MLH1/ITGA9* могут взаимодействовать с другими клеточными белками, обеспечивая комплексное воздействие на биологию измененной клетки. Клетки опухоли, лишённые *MLH1*, но несущие хотя бы одну копию химерного гена *MLH1/ITGA9*, не способны осуществлять репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов, что может проявляться глобальной нестабильностью генома [18].

Для обоих генов *ITGA4* и *ITGA9* нами выявлена ассоциация метилированного состояния промоторных областей с HER2-положительным иммуногистохимическим статусом опухолей, маркирующим высокоагрессивную форму РМЖ. Этот факт косвенно свидетельствует о том, что инактивация этих двух генов может способствовать метастазированию РМЖ.

Семейство белков нидогенов играет существенную роль в поддержании организации и функционирования тканей. Обеспечивая взаимодействие ламинина и коллагена, нидогены участвуют в построении базальной мембраны. На сегодняшний день известно две молекулы этого семейства — нидоген 1 и нидоген 2, последовательности которых гомологичны на 46%, за счет чего, возможно, эти молекулы до некоторой степени взаимозаменяемы [16]. Эксперименты на мышах показали, что инактивация

обоих генов нидогенов приводит к гибели животных до рождения или же в первые 24 часа жизни, ввиду тяжелых аномалий строения различных тканей [3].

Нами обнаружена высокая частота (37,3%) аномального метилирования гена *NID1* при РМЖ. Белок нидоген-1, также известный как энтактин-1, взаимодействует с интегринами, перликаном, фибулином, а также способен образовывать тройной комплекс с коллагеном IV и ламинином-111. Последнее взаимодействие является фундаментальным в построении всех базальных мембран. В тканях молочной железы нидоген-1 экспрессируется мезенхимальными и миоэпителиальными клетками. Предполагается, что нидоген-1 способен модулировать сигналы, передаваемые ламинином-111 (в частности, влиять на экспрессию β -казеина) [24]. Выявленная нами ассоциация метилированного состояния гена *NID1* с HER2-положительным статусом опухолей может косвенно свидетельствовать в пользу того, что инактивация гена *NID1* способствует активному метастазированию РМЖ.

Также выявлена высокая частота (39,3%) метилирования промоторной области гена *NID2*, продуктом которого является белок нидоген-2. Он взаимодействует с теми же молекулами матрикса, что и нидоген-1, за исключением фибулина. Кроме того, нидоген-2 способен связываться с такими белками, как эндостатин и тропозластин [13]. Эксперименты на мышах показали увеличение числа метастазов меланомы в легкие в случае инактивации нидогена-2 [20].

Работа группы Negrini [28] показала, что промоторные области генов *NID1* и *NID2* могут подвергаться аномальному метилированию соответственно в 67% и 29% случаев рака прямой кишки. Кроме того, метилирование обоих регионов было выявлено более чем в 90% образцов рака желудка. В клеточных линиях РМЖ MCF7, MDA-MB-231 и BT-20 показано наличие аномального метилирования промоторных областей генов *NID1* и *NID2*, сопровождающееся отсутствием экспрессии обоих генов. Восстановление экспрессии наблюдалось при добавлении деметилирующего агента к клеткам линии MDA-MB-231 [28].

Нарушение рецепторного репертуара клетки, а также изменение клеточного микроокружения в процессе опухолевой трансформации являются важными факторами, влияющими на развитие, течение и исход заболевания. Очевидно, что результаты представленной работы требуют проведения более детальных исследований. Эффекты интегринов и нидогенов опосредуются не только разнообразием лигандов, связывающихся с ними, но и сложными внутриклеточными сигнальными каскадами. Ввиду этого, актуальной остается проблема идентификации не только повреждений генома, но и связанных с ними изменений спектра сигнальной активности опухолевой клетки.

Список литературы

1. Риппа А.Л., Воротеяк Е.А., Васильев А.В. и др. Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков кожи // *Acta Naturae*. — 2013. — Т. 5, № 4(19). — С. 24–36.
2. Симонова О.А., Кузнецова Е.Б., Поддубская Е.В. и др. Гены ламининов, конститутивно и аномально метилированные при раке молочной железы // *Молекулярная биология*. — 2015. — Т. 49, № 4. — С. 667–677.
3. Bader B.L., Smyth N., Nedbal S. et al. Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice // *Mol. Cell Biol.* — 2005. — Vol. 25(15). — P. 6846–6856.
4. Brown M.C., Staniszewska I., Lazarovici P. et al. Regulatory effect of nerve growth factor in alpha9beta1 integrin-dependent progression of glioblastoma // *Neuro Oncol.* — 2008. — Vol. 10(6). — P. 968–980.
5. Chang E., Park D.I., Kim Y.J. et al. Detection of colorectal neoplasm using promoter methylation of ITGA4, SFRP2, and p16 in stool samples: a preliminary report in Korean patients // *Hepatology*. — 2010. — Vol. 57(101). — P. 720–727.
6. Deb M., Sengupta D., Patra S.K. Integrin-epigenetics: a system with imperative impact on cancer // *Cancer Metastasis Rev.* — 2012. — Vol. 31. — P. 221–234.
7. Do S.I., Ko E., Kang S.Y. et al. Aberrant DNA methylation of integrin $\alpha 4$ in human breast cancer // *Tumour Biol.* — 2014. — Vol. 35(7). — P. 7079–7084.
8. Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism // *Dev Cell.* — 2010. — Vol. 18(6). — P. 884–901.
9. Fiorilli P., Partridge D., Staniszewska I. et al. Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation // *Lab. Invest.* — 2008. — Vol. 88. — P. 1143–1156.
10. Glukhova M.A., Streuli C.H. How integrins control breast biology // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2013. — Vol. 25(5). — P. 633–641.
11. Gossler U., Jonas P., Luz A. et al. Predominant role of alpha 4-integrins for distinct steps of lymphoma metastasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1996. — Vol. 93(10). — P. 4821–4826.
12. Hitchins M.P., Lin V.A., Buckle A. et al. Epigenetic inactivation of a cluster of genes flanking MLH1 in microsatellite-unstable colorectal cancer // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 9107–9116.
13. Ho M.S., Bose K., Mokkalapati S. et al. Nidogens-Extracellular matrix linker molecules // *Microsc. Res. Tech.* — 2008. — Vol. 71(5). — P. 387–395.
14. Kianpour S., Mokaram P., Dehghani M. et al. Aberrant methylation of integrin $\alpha 4$ and e-cadherin using laser capture microdissection of prostate tissue // *Cell Journal (Yakhteh)* — 2011. — Vol. 13 (Supp. 2). — P. 43–44.
15. Klemke M., Weschenfelder T., Konstandin M.H. et al. High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers // *J. Cell Physiol.* — 2007. — Vol. 212(2). — P. 368–374.
16. Kohfeldt E., Sasaki T., Gohring W. et al. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties // *J. Mol. Biol.* — 1998. — Vol. 282(1). — P. 99–109.
17. Lee E.J., Lee B.B., Han J. et al. CpG island hypermethylation of E-cadherin (CDH1) and integrin alpha4 is associated with recurrence of early stage esophageal squamous cell carcinoma // *Int. J. Cancer.* — 2008. — Vol. 123. — P. 2073–2079.
18. Meyer C., Brieger A., Plotz G. et al. An interstitial deletion at 3p21.3 results in the genetic fusion of MLH1 and ITGA9 in a Lynch syndrome family // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15. — P. 762–769.
19. Mitra S., Mazumder Indra D., Bhattacharya N. et al. RBSP3 is frequently altered in premalignant cervical lesions: clinical and prognostic significance // *Genes Chromosomes Cancer.* — 2010. — Vol. 49(2). — P. 155–170.
20. Mokkalapati S., Bechtel M., Reibetanz M. et al. Absence of the Basement Membrane Component Nidogen 2, but Not of Nidogen 1, Results in Increased Lung Metastasis in Mice // *J. Histochem. Cytochem.* — 2012. — Vol. 60(4). — P. 280–289.
21. Mostovich L.A., Prudnikova T.Y., Kondratov A.G. et al. Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast tumors // *Cell Adh. Migr.* — 2011. — Vol. 5(5). — P. 395–401.
22. Muschler J., Levy D., Boudreau R. et al. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62(23). — P. 7102–7109.
23. Park J., Song S.H., Kim T.Y. et al. Aberrant methylation of integrin alpha4 gene in human gastric cancer cells // *Oncogene.* — 2004. — Vol. 23. — P. 3474–3480.
24. Pujuguet P., Simian M., Liaw J. et al. Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression // *J. Cell Sci.* — 2000. — Vol. 113. — P. 849–858.
25. Qian F., Vaux D.L., Weissman I.L. Expression of the integrin $\alpha 4 \beta 1$ on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation // *Cell.* — 1994. — Vol. 77(3). — P. 335–347.
26. Taichman D.B., Cybulsky M.I., Djaffar I. et al. Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1 // *Cell Regul.* — 1991. — Vol. 2(5). — P. 347–355.
27. Uhm K.O., Lee J.O., Lee Y.M. et al. Aberrant DNA methylation of integrin alpha4: a potential novel role for metastasis of cholangiocarcinoma // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 2010. — Vol. 136(2). — P. 187–194.
28. Ulazzi L., Sabbioni S., Miotto E. et al. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer // *Mol. Cancer.* — 2007. — Vol. 28. — P. 6–17.
29. Wehrle-Haller B., Imhof B.A. Integrin-dependent pathologies // *J. Pathol.* — 2003. — Vol. 200(4). — P. 481–487.
30. Weir M.L., Oppizzi M.L., Henry M.D. et al. Dystroglycan loss disrupts polarity and beta-casein induction in mammary epithelial cells by perturbing laminin anchoring // *J. Cell Sci.* — 2006. — Vol. 119. — P. 4047–4058.

DNA methylation of the integrin, nidogen and dystroglycan genes in normal and breast carcinoma tissues

Simonova O.A.¹, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Tanas A.S.^{1,3},
Rudenko V.V.¹, Poddubskaya E.V.⁴, Kekeeva T.V.¹, Kerimov R.A.⁴,
Trotsenko I.D.⁵, Alekseeva E.A.¹, Zaletaev D.V.^{1,2,3}, Strelnikov V.V.^{1,3}

¹ – Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechye St, 1, e-mail: vstrel@list.ru

² – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

³ – Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St, 1, e-mail: zalnem@mail.ru

⁴ – N.N. Blockin Russian Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation, 115478, Kashirskoe highway, 24, e-mail: podd-elena@yandex.ru

⁵ – RUDN University, Moscow, Russian Federation, 117198, Miklukho-Maklaya str. 6, e-mail: trotsenkoivan@mail.ru

Transmembrane cellular receptors and extracellular matrix components play a fundamental role in regulation of cellular activity, and providing concerted integration of the cells in the tissue structure. We have analyzed DNA methylation at the promoter regions of eight integrin genes (*ITGA1*, *ITGA2*, *ITGA3*, *ITGA4*, *ITGA6*, *ITGA7*, *ITGA9*, *ITGB1*), two nidogen genes and a dystroglycan gene in normal breast tissue, as well as in the breast carcinoma samples. Integrin and dystroglycan are transmembrane receptors; nidogens are components of the extracellular matrix. The protein products of these genes are able to interact with proteins of the basement membrane LAMA1, LAMA2 and LAMB1; abnormal methylation of the *LAMA1*, *LAMA2* and *LAMB1* genes in breast cancer had been described in our previous publications. Abnormal methylation frequencies at the promoter regions of genes *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA7*, *ITGA9*, *NID1* and *NID2* in breast cancer accounted for 13.3%, 29.3%, 3.3%, 40.6%, 37.3%, 39.3%, respectively. In our study cohort, DNA methylation at promoter regions of the *ITGA4*, *ITGA9* and *NID1* genes was enriched in HER2 positive tumors, a highly aggressive form of breast cancer.

Key words: extracellular matrix, integrin, nidogen, dystroglycan, DNA methylation, tumor invasion, breast cancer