



Оригинальная статья

Гиперметилирование генов микроРНК miR-124, miR-125b, miR-127 и miR-129 в карциноме яичников вовлечено в подавление их экспрессии и ассоциировано как с развитием, так и с прогрессией рака яичников

Брага Э.А.^{1,2} • Пронина И.В.¹ • Уткин Д.О.³ • Филиппова Е.А.¹ • Бурденный А.М.¹ • Логинов В.И.^{1,2} • Фридман М.В.⁴ • Казубская Т.П.⁵ • Кушлинский Н.Е.⁵

Брага Элеонора Александровна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотр., заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики¹; вед. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний²

✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация.
Тел.: +7 (917) 545 43 93.
E-mail: eleonora10_45@mail.ru

Пронина Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹

Уткин Дмитрий Олегович – врач-хирург, соискатель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования³

Филиппова Елена Александровна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹

Бурденный Алексей Михайлович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹

Логинов Виталий Игоревич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний²

Фридман Марина Владиславовна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории системной биологии и вычислительной генетики⁴

Казубская Татьяна Павловна – д-р мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаборатории клинической онкогенетики⁵

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии⁵

Обоснование. Ранее нами определена группа генов микроРНК (*MIR-107*, *MIR-125B*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* и др.), метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию рака яичников. **Цель** – расширить спектр генов микроРНК, гиперметируемых при раке яичников, и изучить роль этой модификации в патогенезе и прогрессии рака яичников. **Материал и методы.** Исследование выполнено на выборке из 76 образцов рака яичников и 13 перитонеальных метастазах. Использовали метод бисульфитной конверсии ДНК с последующей метилспецифичной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для оценки статуса метилирования генов микроРНК и количественную ПЦР в реальном времени для оценки уровня их экспрессии. **Результаты.** Показано значимое повышение частот метилирования в образцах опухолей в сравнении с гистологически неизменной тканью яичников для 6 исследованных генов микроРНК: *MIR-124-1*, *MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-3}$). Установлено подавление уровня экспрессии 4 микроРНК (*miR-124-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-127-5p*, *miR-129-5p*), кодируемых этими генами, и значимая корреляция между изменениями уровней их экспрессии и метилированием генов ($r_s = 0,63-0,94$, $p \leq 10^{-4}$). Кроме того, выявлены статистически значимые ассоциации метилирования 5 генов (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) с параметрами прогрессии

рака: с клинической стадией, метастазированием, а также с размером и степенью инвазии опухоли, и в меньшей мере – со снижением степени дифференцировки. Связь с метастазированием 5 генов микроРНК подтверждена при анализе перитонеальных макрометастазов от 13 пациенток. **Заключение.** Продемонстрировано функциональное значение aberrантного метилирования группы генов микроРНК в подавлении их экспрессии в карциномах яичников. Показана ассоциация гиперметилирования генов микроРНК с прогрессией рака яичников, включая метастазирование в брюшину.

Ключевые слова: рак яичников, гены микроРНК, гиперметилирование, метастазирование, перитонеальные макрометастазы

Для цитирования: Брага ЭА, Пронина ИВ, Уткин ДО, Филиппова ЕА, Бурденный АМ, Логинов ВИ, Фридман МВ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ. Гиперметилирование генов микроРНК miR-124, miR-125b, miR-127 и miR-129 в карциноме яичников вовлечено в подавление их экспрессии и ассоциировано как с развитием, так и с прогрессией рака яичников. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):47–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-003.

Поступила 19.11.2018; принята к публикации 03.12.2018; опубликована 31.01.2019

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20–1, Российская Федерация

⁴ ФГБНУ «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН; 119333, г. Москва, ул. Губкина, 3, Российская Федерация

⁵ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



Важное место в развитии и прогрессии злокачественных опухолей принадлежит микроРНК [1]. Это семейство коротких рибонуклеиновых кислот длиной 19–24 нуклеотидов, не кодирующих белки или пептиды, но выполняющих функцию посттранскрипционного регулятора экспрессии генов-мишеней и имеющих ключевое значение в онкогенезе. МикроРНК отличается широкая мультитаргетность и способность к наиболее динамичной регуляции генов.

Рак яичников представляет собой группу крайне агрессивных злокачественных опухолей с высокой частотой летальных исходов, что обусловлено выявлением заболевания на поздних стадиях, осложненных метастазированием в лимфатические узлы, брюшину и отдаленные органы [2]. При обнаружении опухолей яичников на I–II клинических стадиях уровень 5-летней выживаемости достигает 70%; однако более половины случаев диагностируют на поздних стадиях, когда уровень 5-летней выживаемости в среднем составляет 30%.

К настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии микроРНК на развитие и прогрессию рака яичников [3]. Показано, что в диагностике и прогнозе течения этого заболевания перспективны профили экспрессии микроРНК [4]. Кроме самих микроРНК системную роль в регуляции их генов-мишеней играют факторы, изменяющие уровень их экспрессии, в том числе aberrантное метилирование регуляторных CpG-островков генов микроРНК. Интересно отметить: среди генов микроРНК гиперметилирование регуляторных CpG-островков встречается в несколько раз чаще, чем среди генов, кодирующих белки [5, 6], что делает их перспективными маркерами опухолей. Профили гиперметилирования генов микроРНК предложены как потенциальные маркеры для диагностики и прогноза рака разной локализации, в частности, рака толстой кишки [7]. В то же время анализ гиперметилирования генов микроРНК в опухолях яичников ограничен единичными исследованиями, например, относительно aberrантного метилирования генов семейства miR-9 [8].

Недавно нами определена группа генов микроРНК (*MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* и др.), метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию рака яичников [9].

Цель данной работы – расширить спектр генов микроРНК, гиперметируемых при раке яичников, и изучить роль метилирования в подавлении экспрессии микроРНК, а также возможную ассоциацию метилирования генов микроРНК с прогрессией этого вида рака.

Материал и методы

Образцы рака яичников собраны и морфологически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан, от всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Анализировали образцы рака яичников у больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Все опухоли яичников были классифицированы в соответствии с системой TNM Международного противоракового союза (Union for International Cancer Control's – UICC) и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной организации здравоохранения [10]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилин-эозином. В исследовании использованы парные образцы опухолей и гистологически неизмененных тканей яичников, полученные от 76 женщин, больных раком яичников, включая 45 образцов от пациенток, у которых не было выявлено метастазов, и 31 образец от пациенток, у которых выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах и/или в брюшине, в отдаленных органах. Кроме того, исследованы 13 образцов первичных опухолей, для которых были также собраны образцы метастазов, обнаруженных в брюшине. Клинико-гистологические характеристики всех опухолевых образцов приведены в табл. 1.

Образцы тканей хранили при -70°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора SilentCrusher S («Heidolph», Германия). Высокомолекулярную ДНК и РНК выделяли из ткани по стандартной методике. Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, как описано ранее [11]. Модифицированную бисульфитом ДНК (1–2 мкг) очищали с помощью Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 («Millipore», США), хранили при -20°C и использовали в качестве матрицы при выполнении метилспецифичной ПЦР. ПЦР проводили в амплификаторе DNA Engine Dyad Cyler T-100 («Bio-Rad», США) с использованием олигонуклеотидов и условий амплификации, описанных в работе [11]. Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, «Thermo Scientific») использовали как контроль для



Клинические и гистологические характеристики	N=76	N=13
Гистологический тип опухоли		
пограничная серозная аденома	6	0
S	67	12
E	5	1
CC	2	0
Mu	2	0
Стадия		
I	13	0
II	14	0
III	44	13
IV	5	0
Степень дифференцировки		
G1	9	0
G2	18	7
G3	42	6
Перитонеальные метастазы		
T3b	1	3
T3c	22	10
Поражение регионарных лимфоузлов		
N0	55	12
N1	21	1
Отдаленные метастазы		
M0	71	13
M1	5	0

Таблица 1.

Клинические и гистологические характеристики основной выборки из 76 образцов первичных опухолей и дополнительной выборки из 13 первичных опухолей и перитонеальных метастазов

S – серозная цистаденокарцинома, E – эндометриоидная цистаденокарцинома, Mu – муцинозная цистаденокарцинома, CC – светлоклеточная цистаденокарцинома, G3 – низко дифференцированная, G2 – умеренно дифференцированная, G1 – высоко дифференцированная

метилированного аллеля, а препарат неметилированной ДНК человека (Male, #G1471, “Promega”) – как контроль для неметилированного аллеля. Продукты ПЦР от разных генов разделяли одновременно с использованием 2% агарозного геля. Чтобы определить интенсивность люминесценции продукта ПЦР, применяли Gel DOC Ez Imager software (“Bio-Rad”). Метилирование учитывали в образцах, в которых сигнал был эквивалентен маркеру (7 нг/мкл).

Уровни экспрессии 4 микроРНК оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием кДНК, полученной для каждого образца, как описано ранее [11], и наборов TaqMan MicroRNA Assays (“Applied Biosystems”, США): miR-124-3p (Assay ID: 001182), miR-125b-5p (Assay ID: 000449), miR-127-5p (Assay ID: 002229) и miR-129-5p (Assay ID: 000590). Для нормализации применяли RNU48 (Assay ID: 001006) и RNU6 (Assay ID: 001093). Все реакции повторяли трижды и с добавлением пробы на отрицательный контроль (без добавления кДНК). Для анализа данных использовали относительную количественную оценку по $\Delta\Delta Ct$ -методу, менее чем двукратные изменения ($|\Delta\Delta Ct| \leq 1$) на уровне микроРНК рассматривались как отсутствие изменений (то есть значениям $\Delta\Delta Ct$

был присвоен 0), а остальные значения $\Delta\Delta Ct$ были округлены до ближайшего целого числа [11].

Для статистической обработки полученных данных использовали программу IBM SPSS Statistics 20. Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера, изменения считали значимыми при $p \leq 0,05$. Применен корреляционный анализ для сопоставления изменений уровня экспрессии и метилирования генов с определением коэффициента Спирмена (r_s). Достоверность значений p проверяли с помощью поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение; результат считали значимым при FDR (false discovery rate), равном 0,05 или ниже.

Результаты

Частоты встречаемости метилирования 6 генов микроРНК (MIR-124-1, MIR-124-2, MIR-124-3, MIR-125B-1, MIR-127, MIR-129-2), исследованных с использованием представительной выборки образцов тканей яичников от 76 пациенток, приведены в табл. 2. Результаты анализа показали статистически значимое повышение частоты метилирования всех 6 исследованных генов в образцах опухолей по сравнению с парными образцами гистологически неизмененных тканей яичников (29–62% против 4–9%; $p \leq 0,001$, FDR=0,01, см. табл. 2). Эти результаты позволяют предположить связь метилирования данных 6 генов с патогенезом рака яичников.

Исследуемые 6 генов кодируют 4 микроРНК (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p), изменения их экспрессии были изучены на подвыборке из 29 образцов рака яичников (табл. 3). У всех 4 исследованных микроРНК наблюдалась высокая частота снижения экспрессии. Так, уровень miR-125b-5p был снижен в 59% образцов рака яичников, miR-129-5p – в 55% ($p \leq 0,05$ по Фишеру, FDR=0,05, см. табл. 3). Что касается miR-124-3p и miR-127-5p, дифференциальная экспрессия (когда и снижение, и повышение наблюдаются с достаточно высокой частотой) отмечена в 76 и 58% образцов рака яичников. При этом для miR-124-3p снижение выявлено почти вдвое чаще, чем повышение (48 против 28%), а у miR-127-5p снижение было в 2,4 раза чаще, чем повышение (41 против 17%). Таким образом, для всех исследованных 4 микроРНК наиболее свойственно снижение экспрессии при раке яичников, что может быть вызвано метилированием регуляторных CpG-островков.

Результаты, полученные на общей подвыборке из 29 парных (опухоль/норма) образцов, были использованы для анализа корреляций между изменениями уровней экспрессии и метилирования

**Таблица 2.** Частота метилирования 6 генов микроРНК в карциноме яичников

Ген микроРНК	Локализация	Опухоль	Условно нормальная ткань	Значение <i>p</i>
<i>MIR-124-1</i>	8p23.1	29%, 22/76	7%, 5/76	5×10^{-4}
<i>MIR-124-2</i>	8q12.3	41%, 31/76	4%, 3/76	3×10^{-8}
<i>MIR-124-3</i>	20q13.33	49%, 37/76	8%, 6/76	2×10^{-8}
<i>MIR-125B-1</i>	11q24.1	57%, 43/76	9%, 7/76	4×10^{-10}
<i>MIR-127</i>	14q32.2	46%, 35/76	7%, 5/76	3×10^{-8}
<i>MIR-129-2</i>	11p11.2	62%, 47/76	7%, 5/76	2×10^{-13}

Даны процент и число образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован, от общего количества образцов ($n = 76$). Условная норма соответствует парным образцам гистологически неизменной ткани яичников ($n = 76$). Статистическая значимость (*p*) определена по тесту Фишера и подтверждена с учетом поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение ($FDR = 0,01$)

Таблица 3. Частота изменений экспрессии 4 микроРНК в карциноме яичников

МикроРНК	Снижение	Повышение	Изменений нет
miR-124-3p	48% (14/29)*	28% (8/29)	24% (7/29)
miR-125b-5p	59% (17/29)**	14% (4/29)	28% (8/29)
miR-127-5p	41% (12/29)*	17% (5/29)	34% (10/29)
miR-129-5p	55% (16/29)**	14% (4/29)	31% (9/29)

Данные количественной полимеразной цепной реакции, полученные на подвыборке из 29 парных образцов рака яичников. Применен тест Фишера

* Статистически значимое превышение частоты снижений экспрессии над увеличениями

** Преобладание случаев со снижением в 2–3 раза (но незначимое статистически)

для 4 микроРНК и 6 кодирующих их генов. Строгая корреляция выявлена между относительным уровнем экспрессии 4 микроРНК (miR-124-3p, -125b-5p, -127-5p, -129-5p) и изменениями метилирования 5 из 6 генов (кроме гена *MIR-124-2*). Коэффициент корреляции Спирмена (r_s) для 5 генов изменялся в пределах 0,63–0,94 ($p \leq 10^{-4}$). При оценке поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение величина $p = 10^{-4}$ найдена значимой при $FDR = 0,01$. Коэффициент корреляции Спирмена (r_s) для гена *MIR-124-2* составил 0,27 ($p = 0,15$), что незначимо. Очевидно, метилирование генов *MIR-124-1* и *MIR-124-3* вносит наибольший вклад в подавление экспрессии miR-124-3p.

Данные по частотам метилирования исследованных генов микроРНК, полученные на репрезентативной выборке из 76 образцов рака яичников, были сопоставлены с клинико-гистологическими характеристиками пациенток (табл. 4). Как видно из данных табл. 4, выявлена

значимая ассоциация метилирования 5 генов (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) с более тяжелыми стадиями ($p \leq 0,02$). Проведено сравнение частот метилирования всех исследованных генов микроРНК в группе пациенток, у которых диагностировано метастазирование в региональных лимфатических узлах, и/или отдаленных органах, и/или в брюшине (31 женщина), и в группе пациенток, у которых метастазирование не обнаружено (45 женщин). Показана высоко значимая ($p \leq 0,01$) ассоциация гиперметилирования с метастазированием для тех же 5 генов (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) (см. табл. 4). Кроме того, для 4 генов – *MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-129-2* – установлена связь метилирования с размером и степенью инвазии опухоли ($p \leq 0,01$, см. табл. 4). Интересно отметить, что наиболее значимую связь с метастазированием проявил ген *MIR-124-2* ($p \leq 10^{-6}$), а со стадией и размером опухоли – *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-5}$).

Обнаружена также связь метилирования этих генов с понижением степени дифференцировки (при переходе от умеренно- и высокодифференцированных опухолей к низкодифференцированным), однако менее выражено (данные не представлены). Так, наиболее значимая ассоциация с понижением степени дифференцировки отмечена для *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-3}$).

Поскольку метастазирование – наиболее важный из связанных с выживаемостью прогностических факторов, метилирование 5 генов, ассоциированных с метастазированием (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*), было изучено на дополнительной выборке из образцов опухолей, собранных вместе с метастазами опухоли яичника в брюшину во время хирургического удаления опухоли у 13 пациенток. Дополнительная выборка образцов включала: 3 триплета, состоящие из образцов условно нормальных тканей, первичных опухолей и перитонеальных метастазов, а также 10 первичных опухолей и 10 парных перитонеальных метастазов. Анализ данных показал наличие метилирования всех 5 генов микроРНК в большинстве первичных опухолей и перитонеальных метастазов, как в триплетах, так и парах, но отсутствие метилирования генов микроРНК в нормальных образцах, представленных в 3 триплетах. Исключения, а именно метилирование генов *MIR-124-3* и *MIR-125B-1* в 2 единичных образцах условной нормы (составившие 13%) и, наоборот, отсутствие метилирования одного из генов в 2 образцах макрометастазов и в единственном образце опухоли составили 13 и 11% соответственно.

**Таблица 4.** Ассоциация метилирования 6 генов микроРНК с прогрессией рака яичников

Группа	Ген микроРНК					
	MIR-124-1	MIR-124-2	MIR-124-3	MIR-125B-1	MIR-127	MIR-129-2
I/II	5/27, 19%	4/27, 15%	7/27, 26%	8/27, 30%	7/27, 26%	7/27, 26%
III/IV	17/49, 35%	27/49, 55%	30/49, 61%	35/49, 71%	28/49, 57%	40/49, 82%
P	0,2	0,6 × 10 ^{-3*}	0,004*	0,6 × 10 ^{-3*}	0,02*	4 × 10 ^{-6**}
Нет	10/45, 22%	8/45, 18%	16/45, 36%	17/45, 38%	15/45, 33%	21/45, 47%
Есть	12/31, 39%	23/31, 74%	21/31, 68%	26/31, 84%	20/31, 64%	26/31, 84%
P	0,1	1 × 10 ^{-6**}	0,01*	0,7 × 10 ^{-4*}	0,01*	0,002*
T1	1/13, 8%	1/13, 8%	2/13, 15%	1/13, 8%	3/13, 23%	3/13, 23%
T2	4/15, 27%	4/15, 27%	6/15, 40%	8/15, 53%	6/15, 40%	5/15, 33%
T3	17/48, 35%	26/48, 54%	29/48, 60%	34/48, 71%	26/48, 54%	39/48, 81%
P	0,2	0,004*	0,01*	1 × 10 ^{-4*}	0,1	1 × 10 ^{-5**}

I/II – ранние, III/IV – поздние клинические стадии; «нет» – группа пациенток без метастазов, «есть» – группа пациенток с метастазами; T1, T2, T3 характеризуют размер и степень инвазии опухоли и соответствуют T1a–c, T2a–c, T3a–c [10]. С учетом поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение значения $p \leq 0,01$ статистически достоверны при FDR = 0,05

* Статистически значимые величины p

** Наиболее высоко значимые величины p

Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о системной роли гиперметилирования 6 генов микроРНК (MIR-124-1, MIR-124-2, MIR-124-3, MIR-125B-1, MIR-127, MIR-129-2) в эпигенетической модификации ДНК в процессе развития первичных опухолей, которая приводит к подавлению их экспрессии. Это подтверждает функциональную роль aberrантного метилирования регуляторных областей генов в патогенезе рака яичников. Кроме того, показана ассоциация гиперметилирования 5 генов микроРНК (MIR-124-2, MIR-124-3, MIR-125B-1, MIR-127, MIR-129-2) с прогрессией рака яичников: с более поздней стадией, с увеличением размера опухоли и инвазии, а также с метастазированием в брюшину, региональные лимфоузлы и отдаленные ткани. При этом данные по связи метилирования 5 генов микроРНК с метастазированием валидированы в образцах перитонеальных макрометастазов.

В отношении дальнейших эпигенетических aberrаций в клетках уже вторичных опухолей мы не обнаружили значимых изменений в статусе метилирования данных 5 генов микроРНК в перитонеальных метастазах в сравнении с первичной опухолью. Очевидно, требуются дальнейшие исследования на

более представительных выборках образцов макрометастазов. Так, в работе W.A. Schrijver и соавт. с участием Голландского консорциума по макрометастазам рака молочной железы (Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium) отмечено, что изменения экспрессии микроРНК в макрометастазах в сравнении с первичной «метастазирующей» опухолью не такие выраженные, как между «метастазирующей» опухолью и «неметастазирующей», хотя и выявлено изменение уровня экспрессии отдельных микроРНК [12].

Как известно, метастатические клетки в процессе продвижения от первичной опухоли претерпевают дальнейшие изменения, например, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который может динамично обращаться вспять, и тогда клетки могут претерпевать обратный – мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), как и другие процессы репрограммирования опухолевой клетки в процессе ее миграции и колонизации в органе-мишени [3]. По-видимому, вторичная опухоль может, в частности, обладать характеристиками эпителиальных клеток в большей степени, чем исходная родительская опухоль. Так, интересная особенность обнаружена для miR-424, уровень которой повышен в первичных опухолях рака молочной железы, но понижен в метастазах по сравнению с родительскими первичными опухолями [13]. Авторы предполагают двухфазное изменение экспрессии этой микроРНК при смене ЭМП на МЭП. При ЭМП miR-424 проявляет свойства онкогена, а при обратном переходе, МЭП, она выступает как антиметастатическая и супрессорная микроРНК.

Следует отметить: несмотря на то, что к настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии микроРНК на метастазирование рака яичников (точнее, на свойства «метастазирующих» первичных опухолей [3]), практически отсутствуют работы, направленные на изучение функции микроРНК и тем более метилирования генов микроРНК в макрометастазах, в том числе перитонеальных метастазах рака яичников. И эта задача представляется весьма актуальной и интересной.

Выводы

Установлено функциональное значение aberrантного метилирования группы генов микроРНК в подавлении их экспрессии в карциномах яичников.

Показана ассоциация гиперметилирования генов микроРНК с прогрессией рака яичников, включая метастазирование в брюшину. ☺



Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено за счет средств Российского научного фонда, грант 14-15-00654.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Э.А. Брага – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; И.В. Пронина – проведение эксперимента по анализу экспрессии

генов и анализ результатов; Д.О. Уткин – сбор клинического материала и анализ клинико-гистологических характеристик образцов; Е.А. Филиппова и А.М. Бурденный – проведение части эксперимента по анализу метилирования генов и анализ результатов; В.И. Логинов – концепция и дизайн экспериментальной части исследования, анализ и интерпретация результатов исследования; М.В. Фридман – биоинформатический анализ, статистический анализ; Т.П. Казубская – сбор клинического материала и клинико-гистологических характеристик образцов, редактирование текста; Н.Е. Кушлинский – организация сбора клинического материала, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература

1. Логинов ВИ, Рыков СВ, Фридман МВ, Брага ЭА. Метилирование генов микрорнк и онкогенез (обзор). *Биохимия*. 2015;80(2): 184–203.
2. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249393. doi: 10.1155/2014/249393.
3. Брага ЭА, Фридман МВ, Кушлинский НЕ. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК. *Биохимия*. 2017;82(5): 717–31.
4. Shi M, Mu Y, Zhang H, Liu M, Wan J, Qin X, Li C. MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(32):e11505. doi: 10.1097/MD.00000000000011505.
5. Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res*. 2011;717(1–2):77–84. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
6. Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2405–19. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7.
7. Weisenberger DJ, Liang G, Lenz HJ. DNA methylation aberrancies delineate clinically distinct subsets of colorectal cancer and provide novel targets for epigenetic therapies. *Oncogene*. 2018;37(5):566–77. doi: 10.1038/onc.2017.374.
8. Li X, Pan Q, Wan X, Mao Y, Lu W, Xie X, Cheng X. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:509. doi: 10.1186/s12885-015-1509-1.
9. Брага ЭА, Логинов ВИ, Бурденный АМ, Филиппова ЕА, Пронина ИВ, Куревлев СВ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Уткин ДО, Ермилова ВД, Кушлинский НЕ. Пять гиперметилированных генов микрорнк как потенциальные маркеры рака яичников. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017;164(9):335–40.
10. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Vol. 6. Lyon: IARC; 2014. 307 p.
11. Pronina IV, Loginov VI, Burdenny AM, Fridman MV, Senchenko VN, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. 2017;604:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.
12. Schrijver WA, van Diest PJ; Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium, Moelans CB. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. *Oncotarget*. 2017;8(2):3111–23. doi: 10.18632/oncotarget.13623.
13. Drasin DJ, Guarnieri AL, Neelakantan D, Kim J, Cabrera JH, Wang CA, Zaberezhnyy V, Gasparini P, Cascione L, Huebner K, Tan AC, Ford HL. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibiting Tumor Initiation. *Cancer Res*. 2015;75(9):1908–21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2394.
8. Li X, Pan Q, Wan X, Mao Y, Lu W, Xie X, Cheng X. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:509. doi: 10.1186/s12885-015-1509-1.
9. Брага ЭА, Логинов ВИ, Бурденный АМ, Филиппова ЕА, Пронина ИВ, Куревлев СВ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Уткин ДО, Ермилова ВД, Кушлинский НЕ. Five hypermethylated microRNA genes as potential markers of ovarian cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2018;164(3):351–5. doi: 10.1007/s10517-018-3988-y.
10. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Vol. 6. Lyon: IARC; 2014. 307 p.

References

1. Loginov VI, Rykov SV, Fridman MV, Braga EA. Methylation of miRNA genes and oncogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2015;80(2):145–62. doi: 10.1134/S0006297915020029.
2. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249393. doi: 10.1155/2014/249393.
3. Braga EA, Fridman MV, Kushlinskii NE. Molecular mechanisms of ovarian carcinoma metastasis: Key genes and regulatory microRNAs. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(5): 529–41. doi: 10.1134/S0006297917050017.
4. Shi M, Mu Y, Zhang H, Liu M, Wan J, Qin X, Li C. MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(32):e11505. doi: 10.1097/MD.00000000000011505.
5. Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res*. 2011;717(1–2):77–84. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
6. Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2405–19. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7.
7. Weisenberger DJ, Liang G, Lenz HJ. DNA methylation aberrancies delineate clinically distinct subsets of colorectal cancer and provide novel targets for epigenetic therapies. *Oncogene*. 2018;37(5):566–77. doi: 10.1038/onc.2017.374.
8. Li X, Pan Q, Wan X, Mao Y, Lu W, Xie X, Cheng X. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:509. doi: 10.1186/s12885-015-1509-1.
9. Braga EA, Loginov VI, Burdenny AM, Filippova EA, Pronina IV, Kurevlev SV, Kazubskaya TP, Kushlinskii DN, Utkin DO, Ermilova VD, Kushlinskii NE. Five hypermethylated microRNA genes as potential markers of ovarian cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2018;164(3):351–5. doi: 10.1007/s10517-018-3988-y.
10. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Vol. 6. Lyon: IARC; 2014. 307 p.



11. Pronina IV, Loginov VI, Burdenny AM, Fridman MV, Senchenko VN, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. 2017;604:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.

12. Schrijver WA, van Diest PJ; Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium, Moelans CB. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. *Oncotarget*. 2017;8(2):3111–23. doi: 10.18632/oncotarget.13623.

13. Drasin DJ, Guarnieri AL, Neelakantan D, Kim J, Cabrera JH, Wang CA, Zaberezhnyy V,

Gasparini P, Cascione L, Huebner K, Tan AC, Ford HL. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibiting Tumor Initiation. *Cancer Res*. 2015;75(9):1908–21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2394.

Hypermethylation of the microRNA miR-124, miR-125b, miR-127, and miR-129 in ovarian carcinoma is involved in suppression of their expression and associated with both the development and progression of ovarian cancer

E.A. Braga^{1,2} • I.V. Pronina¹ • D.O. Utkin³ • E.A. Filippova¹ • A.M. Burdenny¹ • V.I. Loginov^{1,2} • M.V. Fridman⁴ • T.P. Kazubskaya⁵ • N.E. Kushlinskii⁵

Rationale: We have previously identified a group of microRNA genes (*MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* et al.), whose methylation was involved into the development and progression of ovarian cancer. **Aim:** To expand the range of microRNA genes hypermethylated in ovarian cancer and to study the role of this modification in the pathogenesis and progression of ovarian cancer. **Materials and methods:** The study was performed on a series of 76 ovarian cancer and 13 peritoneal metastases samples. The method of bisulfite DNA conversion followed by methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) was used to assess the methylation status of the microRNA genes; the expression of these genes was measured by quantitative real-time PCR. **Results:** Compared to histologically unchanged ovarian tissue, there was a significant increase in methylation frequencies in the tumor samples for 6 microRNA genes studied: *MIR-124-1*, *MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, and *MIR-129-2* ($p \leq 10^{-3}$). The expression level of 4 microRNAs (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p) encoded by these genes was suppressed, with a significant correlation between changes in their expression levels and the gene methylation ($r_s = 0.63–0.94$, $p \leq 10^{-4}$). In addition, there were statistically significant associations between methylation of 5 genes (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, and *MIR-129-2*) and the parameters of cancer progression,

such as its clinical stage, metastatic spread, tumor size and invasion, and to a lesser extent with a decrease in the differentiation grade. The association of 5 microRNA genes with metastatic spread was confirmed by the analysis of peritoneal macro-metastases from 13 patients. **Conclusion:** We have demonstrated the functional significance of aberrant methylation in a group of microRNA genes for suppression of their expression in ovarian carcinomas. There is an association of microRNA gene hypermethylation with the progression of ovarian cancer, including metastatic spread to the peritoneum.

Key words: ovarian cancer, microRNA genes, hypermethylation, metastasis, peritoneal macro-metastases

For citation: Braga EA, Pronina IV, Utkin DO, Filippova EA, Burdenny AM, Loginov VI, Fridman MV, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE. Hypermethylation of the microRNA miR-124, miR-125b, miR-127, and miR-129 in ovarian carcinoma is involved in suppression of their expression and associated with both the development and progression of ovarian cancer. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(1):47–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-003.

Received 19 November 2018; accepted 03 December 2018; published 31 January 2019

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 14-15-00654.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Eleonora A. Braga – PhD, Doctor of Biol. Sci., Professor, Chief Research Fellow, Head of the Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Leading Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetics of Complicated Inherited Diseases²
✉ 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 545 43 93.
E-mail: eleonora10_45@mail.ru

Irina V. Pronina – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹

Dmitriy O. Utkin – MD, Surgeon, Applicant, Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Postgraduate Education³

Elena A. Filippova – Postgraduate Student, Junior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹

Alexey M. Burdenny – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹

Vitaly I. Loginov – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular Genetics of Complicated Inherited Diseases²

Marina V. Fridman – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Systems Biology and Computational Genetics⁴

Tatiana P. Kazubskaya – MD, PhD, Oncogenetic Physician, Senior Research Fellow, Laboratory of Clinical Oncogenetics⁵

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Head of Clinical Biochemistry Laboratory⁵

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation

²Medical Genetic Science Center; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

³A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; 20–1 Delegatskaya ul., Moscow, 127473, Russian Federation

⁴Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina ul., Moscow, 119333, Russian Federation

⁵N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation