

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ LABORATORY AND EXPERIMENTAL STUDIES

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-45-53

УДК: 618.19:576.385:577.2

Для цитирования: Андреева О.Е., Сигин В.О., Стрельников В.В., Танас А.С., Щербаков А.М., Красильников М.А. Изменение профиля метилирования ДНК в тамоксифен-резистентных сублиниях клеток MCF-7. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(5): 45–53. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-45-53.

For citation: Andreeva O.E., Sigin V.O., Strelnikov V.V., Tanas A.S., Scherbakov A.M., Krasilnikov M.A. Changes in DNA methylation profile in tamoxifen-resistant MCF-7 sublines. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(5): 45–53. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-45-53.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ТАМОКСИФЕН-РЕЗИСТЕНТНЫХ СУБЛИНИЯХ КЛЕТОК MCF-7

О.Е. Андреева¹, В.О. Сигин², В.В. Стрельников^{2,3}, А.С. Танас^{2,3},
А.М. Щербаков¹, М.А. Красильников¹

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия¹

Россия, г. Москва, 115478, Каширское шоссе, 23. E-mail: tilberta@gmail.com¹

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва, Россия²

Россия, г. Москва, 115522, ул. Москворечье, 1. E-mail: sigin.vladimir@gmail.com²

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия³

Россия, г. Москва, 117997, ул. Островитянова, 1. E-mail: tanas80@gmail.com³

Аннотация

Введение. Ранее мы показали возможность горизонтального распространения гормональной резистентности от клетки к клетке при совместном культивировании чувствительных и резистентных клеток и/или через экзосомы, секретируемые резистентными клетками. Каков механизм подобного распространения резистентности, и в какой мере клетки со вторичной резистентностью воспроизводят характеристики донорских резистентных клеток – для ответа на эти вопросы был проведен анализ общего уровня метилирования ДНК в клетках эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7 и эстрогеннезависимых сублиниях. **Цель исследования** – изучение профиля метилирования ДНК при развитии гормональной резистентности и его значения в закреплении резистентного фенотипа клеток рака молочной железы. **Методы.** Метилирование ДНК исследовали методом RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) в клетках рака молочной железы MCF-7 и резистентных сублиниях. **Результаты.** Выявлено 19 динуклеотидов CpG, дифференциально и в целом однунаправленно метилированных в клетках с первичной и вторичной резистентностью к тамоксифену. Дифференциальное изменение метилирования было обнаружено для участков ДНК, регулирующих экспрессию шести белок-кодирующих генов: PRKCZ, TRAPPC9, ASIC2, C2CD4a, ZNF787, CRTAC1. Проведенный биоинформационический анализ показал, что два из этих шести генов, PRKCZ (protein kinase C Zeta) и TRAPPC9 (Trafficking Protein Particle Complex Subunit 9), напрямую вовлечены в регуляцию активности NF-кБ. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о существовании общих паттернов ДНК, метилирование которых изменяется в одном направлении в клетках с первичной и вторичной резистентностью. Участие двух из идентифицированных генов в регуляции NF-кБ может свидетельствовать о включении последнего в формирование резистентного фенотипа опухолевых клеток, в том числе в условиях горизонтального переноса резистентности.

Ключевые слова: рак молочной железы, тамоксифен, экзосомы, гормональная резистентность, метилирование.

CHANGES IN DNA METHYLATION PROFILE IN TAMOXIFEN-RESISTANT MCF-7 SUBLINES

**O.E. Andreeva¹, V.O. Sigin², V.V. Strelnikov^{2,3}, A.S. Tanas^{2,3},
A.M. Scherbakov¹, M.A. Krasilnikov¹**

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia¹
 24, Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia. E-mail: tilberta@gmail.com¹
 Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia²
 1, Moskvorechye St., Moscow, 115522, Russia. E-mail: sigin.vladimir@gmail.com²
 Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia³
 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia. E-mail: tanas80@gmail.com³

Abstract

Introduction. We have previously shown the feasibility of hormonal resistance horizontal distribution from cell to cell, with the joint cultivation of sensitive and resistant cells and/or through exosomes secreted by resistant cells. What is the mechanism of such resistance distribution, and how do cells with secondary resistance reproduce the characteristics of donor resistant cells? To answer these questions, we analyzed the overall level of DNA methylation in MCF-7 estrogen-dependent breast cancer cells and estrogen-independent sublines. **The purpose of the study** was to analyze DNA methylation profiles for the development of hormonal resistance by breast cancer cells and for resistant phenotype further accession. **Methods.** DNA methylation was evaluated by the RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) method in MCF-7 breast cancer cells and their resistant sublines. **Results.** 19 CpG dinucleotides, differentially and generally unidirectionally methylated in cells with primary and secondary resistance to tamoxifen, were detected. Differential changes in methylation were found for DNA regions that regulated the expression of six protein-coding genes: PRKCZ, TRAPPC9, ASIC2, C2CD4A, ZNF787, CRTAC1. Bioinformatics analysis showed that two of these six genes, PRKCZ (protein kinase C Zeta) and TRAPPC9 (Trafficking Protein Particle Complex Subunit 9) were directly involved in the regulation of NF-κB activity. **Conclusion.** The data obtained indicate the existence of common DNA patterns, the methylation of which varies in the same direction in cells with primary and secondary resistance. The involvement of two of the identified genes in the regulation of NF-κB may indicate the inclusion of the latter in the formation of a resistant phenotype of tumor cells, even under conditions of horizontal transfer of resistance.

Key words: breast cancer, tamoxifen, exosomes, hormonal resistance, methylation.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у женщин и основной причиной смерти женщин от онкологических заболеваний. По уровню заболеваемости за РМЖ следуют колоректальный рак и рак легких (по показателю смертности у этих двух нозологий порядок обратный) [1]. Рак молочной железы – крайне гетерогенное заболевание [2–4]. В современной литературе растет количество доказательств поликлональности канцерогенеза, описанной для большинства опухолей, за исключением миелоидных (для последних характерно моноклональное происхождение) [5, 6]. Гетерогенность опухолевых клеток частично обусловлена эпигенетическими вариациями; эпигенетическая пластичность вместе с генетическими нарушениями стимулируют опухолевую прогрессию [7].

Особую роль в развитии РМЖ имеет рецептор эстрогенов. Рецептор эстрогенов (ER) является транскриptionальным фактором, который после связывания лиганда-эстрадиола, димеризации и

попадания в ядро активирует транскрипцию своих генов-мишеней через эстроген-рееспонсивные участки в их промоторах; это классическое геномное действие сигнального каскада эстрогенового рецептора [8]. Неклассические геномные эффекты включают образование комплексов с транскрипционными факторами, ER/Sp1 и ER/AP-1, в ответ на связывание рецептора эстрогенов с лигандом [9, 10].

Антигормональные соединения, такие как антиэстроген тамоксифен, блокируют эстрогензависимый клеточный рост. Важную роль в развитии резистентности к тамоксифену играет активация сигнальных путей в обход рецептора, в том числе активация негативных регуляторов ERα, таких как транскрипционный фактор NF-κB, SNAI1 и ряд других [11–13]. Особую роль как в канцерогенезе РМЖ, так и в развитии резистентности к антиэстрогену тамоксифену играет эпигенетический контроль [14, 15], однако вопрос, каким образом эпигенетическая регуляция связана с развитием и передачей резистентности к антиэстрогенам, до сих пор во многом остается без ответа.

Целью исследования явилось изучение эпигенетических изменений и выявление паттернов метилирования при развитии гормональной резистентности клеток РМЖ.

Материал и методы

Культивирование клеток

Клетки эстрогензависимого РМЖ человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 7 % эмбриональную сыворотку телят (FBS HyClone, США) и гентамицин (50 ед/мл) («ПанЭко», Россия), при 37 °C и 5 % CO₂. При анализе скорости роста и чувствительности к тамоксифену количество клеток определяли либо при подсчете в камере Горяева, либо с использованием МТТ-теста, основанного на утилизации живыми клетками реагента МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилте-тразол бромида). Тамоксифен-резистентная субпопуляция MCF-7/T была получена путем длительной (60 сут) селекции клеток MCF-7 в присутствии антиэстрогена тамоксифена. После окончания селекции полученную сублинию культивировали в стандартных условиях (не более 6 мес). Субпопуляция MCF-7/R была получена при ко-культивировании клеток MCF-7 с меченными GFP клетками MCF-7/T в течение 14 сут с последующим клонированием клеток MCF-7; контрольная сублиния MCF-7/C была получена при клонировании родительских клеток MCF-7. Сублинии MCF-7/exoT и MCF-7/exoC были получены путем культивирования в течение 10 сут клеток MCF-7 с экзосомами клеток MCF-7/T и MCF-7 соответственно. Сравнительный анализ чувствительности к тамоксифену в парах MCF-7/R–MCF-7/C и MCF-7/exoT – MCF-7/exoC выявил частичную резистентность к тамоксифену клеток MCF-7/R и MCF-7/exoT [16], что позволило в дальнейшем использовать эти линии в качестве моделей вторичной гормональной резистентности.

Выделение ДНК

При выделении геномной ДНК использовали следующий протокол:

1. Клетки помещали в пробирку и добавляли 0,5 мл экстракционного буфера (10 mM Tris-HCl, 2 mM ЭДТА, 4 mM NaCl, pH=8,0).
2. Добавляли протеиназу K до концентрации 50 мкг/мл.
3. Инкубировали 10–16 ч при 56 °C.
4. Последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ и хлороформом.
5. К образцу добавляли 1/10 объема 5 М ацетата натрия (рН 5,3) перемешивали и осаждали ДНК 2,5 объемами холодного 96 % этанола, выдерживали образец 30 мин при температуре -70 °C.
6. Пробу центрифugировали 15 мин с ускорением 12 000 g. Высушивали осадок ДНК на воздухе и растворяли в 0,2 мл TE, pH 8,0.

Широкогеномное бисульфитное секвенирование XmaI-RRBS

RRBS (Reduced representation bisulfite sequencing) увеличивает относительную информационную ценность анализа метилирования ДНК методом NGS в сравнении с полногеномным бисульфитным секвенированием, так как каждая прочитанная последовательность RRBS включает, по меньшей мере, одну информативную последовательность CpG. В отличие от полногеномного секвенирования, библиотеки RRBS изготавливаются с использованием специфической эндонуклеазы рестрикции, которая образует пул фрагментов, богатых CpG-участками. Это значительно снижает долю генома, подвергающегося секвенированию, и обогащает его наиболее релевантными регионами [17].

Подготовка библиотек XmaI-RRBS проводилась согласно разработанному Tanas et. al. протоколу [18]. Геномная ДНК, обработанная эндонуклеазой рестрикции XmaI (Сибэнзим, Россия), была частично затуплена 5-метил-цитозинами с помощью фрагмента Кленова (3'-5' –exo-). Частично затупленные фрагменты ДНК лигировали с синтезированными 5-метилцитозин-содержащими адаптерами. После лигирования неметилированные цепи адаптера ник-транслировали путем добавления dATP, dTTP, dGTP, 5-метил-dCTP и Taq ДНК-полимеразы. Полученные фрагменты библиотеки отбирали по длине с помощью препаративного электрофореза Pippin Prep (Sage Science) в соответствии с инструкциями производителя для получения фракции 181–311 п.н. фрагментов (186–316 п.н. в случае адаптеров со штрих-кодом). Бисульфитное конвертирование элюированной фракции проводили с помощью набора Bisulfite EpiTect (Qiagen Cat # 59104). Для предотвращения неспецифического праймирования полимеразной реакции 3'-концами деградированных фрагментов ДНК фрагменты обрабатывали терминирующими нуклеотидами (ddNTP) с помощью набора SNaPshot Multiplex (Thermo Fisher Scientific, MA, USA, Cat # 4323163). Терминированные фрагменты ДНК обрабатывали РНКазой A (Sigma-Aldrich, MO, USA, Cat # 9001-99-4) и щелочной фосфатазой (SibEnzyme Cat # E328), что позволяет удалить РНК-носитель, использованный в протоколе EpiTect Bisulfite, и дефосфорилировать остаточные ddNTP соответственно. Аликвоту продукта использовали для проведения аналитической количественной ПЦР с целью определения количества циклов последующей препаративной ПЦР. Конечные библиотеки были получены с помощью ПЦР с количеством циклов, определенным для образца с помощью аналитической количественной ПЦР (обычно в диапазоне от 12 до 18 циклов). Полученные библиотеки очищали, измеряли их концентрации на флуорометре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) и разводили до рабочей концентрации 100 пМ.

Эмульсионную ПЦР с объединенными библиотеками проводили с использованием прибора Ion OneTouch и набора Ion OneTouch 200 Template Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat # 4480974) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные ISP были обогащены при 37 °C с использованием системы Ion OneTouch ES (Thermo Fisher Scientific). Библиотеки XmaI-RRBS секвенировали на Ion Personal Genome Machine (PGM) с использованием набора для секвенирования Ion PGM 200 и чипа Ion 318 (Thermo Fisher Scientific).

Обработка результатов секвенирования

Результаты секвенирования обрабатывали с использованием программного обеспечения Ion Torrent Suite™ Software. Полученные последовательности выравнивали на полный референсный геном человека (build GRCh37/hg19) с помощью программы Bismark [19], последовательности конвертировали в варианты C>T и G>A (соответственно конверсии C>T на обратной нити), затем выравнивали на эквивалентно конвертированные варианты референсного генома и определяли лучший результат среди полученных в итоге четырех параллельных процессов выравнивания. Используемое в процессе подготовки библиотек XmaI-RRBS частичное тупление концов фрагментов ДНК, подразумевающее их достройку остатками 5-метилцитозина, создаёт артефактное метилирование 3'-концевых CpG-динуклеотидов фрагментов. Такие искусственно метилированные цитозины исключали из анализа с помощью скрипта на языке программирования Python (код опубликован нами ранее [17]). Также с помощью программы Bismark определяли уровень метилирования CpG-динуклеотидов. Дифференциальную метилированностью считали CpG-динуклеотиды при изменении уровня метилирования $|\Delta(b\text{-value})| > 0.9$.

Чтобы отобрать дифференциальную метилированные CpG-пары, в целом однократно изменяющие уровень метилирования при развитии резистентности к тамоксифену, во всех трех парах клеточных линий, рассчитывали значение

$$D = (b_{MCF-7/T} - b_{MCF-7}) + (b_{MCF-7/R} - b_{MCF-7}) - (b_{MCF-7/C} - b_{MCF-7}) - (b_{MCF-7/exoC} - b_{MCF-7}),$$

где $b - b\text{-value}$ – уровень метилирования CpG-пары в клеточной линии. Отбирали CpG-пары, удовлетворяющие $|D| > 0.9$.

Результаты

Эксперименты проводились на клетках эстрогенависимого рака молочной железы MCF-7 и тамоксифен-резистентной сублинии MCF-7/T, полученной в результате длительного культивирования клеток MCF-7 с тамоксифеном. Ранее мы показали возможность передачи гормональной резистентности горизонтальным путем, от резистент-

ных MCF-7/T к чувствительным клеткам MCF-7, при их совместном культивировании в условиях *in vitro*. Клетки с приобретенной таким образом вторичной резистентностью были клонированы и получили название MCF-7/R, клонированные контрольные клетки – MCF-7/C. При исследовании роли экзосом в подобной передаче резистентного фенотипа обнаружено, что регулярное добавление (в течение 10 сут) к родительским клеткам MCF-7 экзосом, полученным от резистентных клеток MCF-7/T, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к тамоксифену (сублиния MCF-7/exoT). В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью, и их добавление не приводит к изменению гормональной чувствительности клеток (сублиния MCF-7/exoC) [16].

Основной задачей настоящего исследования явилось изучение возможного механизма горизонтального пути распространения резистентности и дальнейшего закрепления резистентного фенотипа опухолевых клеток. В какой мере характеристики клеток с вторичной резистентностью, развившейся в результате совместного культивирования чувствительных клеток с резистентными, или при действии экзосом резистентных клеток, воспроизводят характеристики донорских резистентных клеток – для ответа на этот вопрос был проведен широкогеномный анализ метилирования ДНК в чувствительных и резистентных клетках MCF-7.

Анализ метилирования методом RRBS выявил 95 динуклеотидов CpG с дифференциальным метилированием в первой паре сублиний MCF-7 и MCF-7/T, во второй паре (MCF-7/C и MCF-7/R) обнаружен 91 дифференциально метилированный динуклеотид, а в третьей паре сублиний MCF-7/exoC и MCF-7/exoT обнаружено 23 таких динуклеотида. Сопоставление выборок выявило 19 динуклеотидов CpG, дифференциально и в целом однократно метилированных при развитии резистентности к тамоксифену во всех трех парах клеточных линий. Схематическое изображение выборок представлено на рис. 1.

Для дальнейшего анализа были отобраны 19 динуклеотидов CpG с дифференциальным метилированием, обнаруженные во всех трех парах сублиний. На рис. 2 представлены значения параметра B-value, характеризующие уровень метилирования цитозинов по шкале от 1 (метилирование 100 %) до 0 (отсутствие метилирования) по каждой сублини. Для большей части CpG (15 из 19) было отмечено повышение метилирования в резистентных сублиниях по сравнению с чувствительными. Гиперметилирование во всех резистентных сублиниях по сравнению с контрольными было отмечено в:

- 1) межгенных участках: chr2:130344496-130344497, chr4:1040977-1040978, chr2:52799788-52799789, chr7:101361449-101361450, chr11:1858802-1858803;

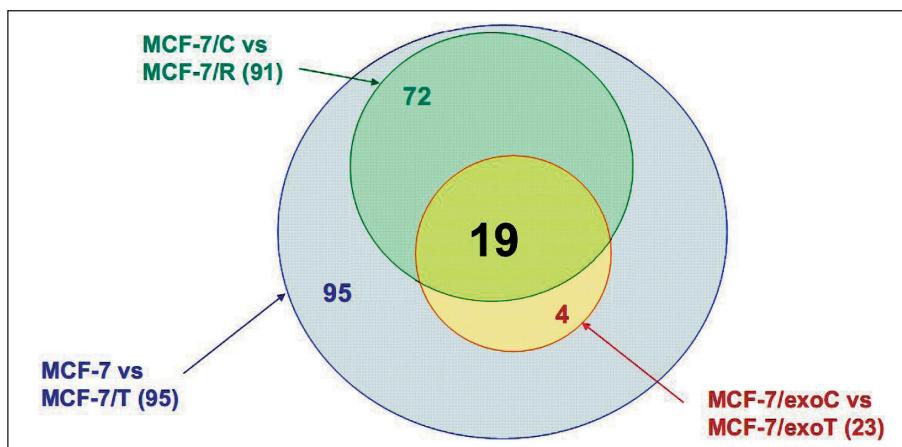


Рис. 1. Диаграмма Эйлера – Венна. Цифрами указано количество дифференциально метилированных CpG-пар для каждой пары клеточных линий

		метилирование (B-value)					
	координаты GRCh37/hg19	MCF-7	MCF-7/T	MCF-7/C	MCF-7/R	MCF-7/exoC	MCF-7/exoT
1	chr1:2036833-2036834	0,67	0,04	0,37	0,22	0,88	0,23
2	chr10:99734998-99734999	0,37	0,05	0,48	0,11	1	1
3	chr12:132107115-132107116	0,51	0,31	0,7	0,32	1	0
4	chr19:2462305-2462306	0,3	0,27	0,66	0,37	1	0,18
5	chr10:99734891-99734892	0,75	1	0,28	1	0,52	1
6	chr11:1858802-1858803	0,89	0,91	0,16	0,38	0,08	0,86
7	chr14:102026722-102026723	0,68	0,57	0,24	0,58	0	0,62
8	chr15:62360801-62360802	0,54	0,72	0,2	0,4	0	0
9	chr17:31620119-31620120	0,56	0,54	0	0,61	0,21	0,47
10	chr19:56609978-56609979	0,76	0,87	0,56	0,89	0,25	1
11	chr2:130344496-130344497	0,29	1	0,15	0,69	0,15	0,38
12	chr2:16154295-16154296	0,35	0,96	0,43	0,48	0	1
13	chr2:52799788-52799789	0	0,58	0,13	0,63	0	0,96
14	chr4:1040977-1040978	0,39	0,9	0,53	1	0,25	0,42
15	chr7:101361449-101361450	0	0,46	0	0,87	0,28	0,79
16	chr8:141109628-141109629	0,42	0,75	0,27	0,66	0,23	0,91
17	chr8:141109651-141109652	0,42	0,81	0,27	0,71	0,28	1
18	chr8:141109655-141109656	0,42	0,89	0,24	0,7	0,31	1
19	chr8:141109686-141109687	0,42	0,92	0,28	0,67	0,31	1

Рис. 2. Уровни метилирования динуклеотидов CpG в трех парах сублиний по результатам RRBS. Приведены значения B-value для каждой координаты дифференциально метилированных CpG по 6 клеточным линиям

2) внутригенных участках РНК-генов AC010145.4 (chr2:16154295-16154296), DIO3OS (chr14:102026722-102026723);

3) внутригенных участках генов, кодирующих белки (по большей части в экзонах и внутригенных энхансерах, подробнее см. ниже).

Гиперметилирование отмечено в CpG генов CRTAC1 (chr10:99734891-99734892), TRAPPC9 (chr8:141109628-141109629, chr8:141109651-141109652, chr8:141109686-141109687, chr8:141109655-141109656), ASIC2 (chr17:31620119-31620120), C2CD4A (chr15:62360801-62360802), ZNF787 (chr19:56609978-56609979).

Гипометилирование во всех резистентных сублиниях по сравнению с контрольными было отмечено для 4 CpG, среди которых:

1) 2 CpG относятся к последовательностям белок-кодирующих генов: PRKCZ (chr1:2036833-2036834), CRTAC1 (chr10:99734998-99734999);

2) РНК-ген RP11-495K9.9 (chr12:132107115-132107116);

3) CpG из межгенного пространства (chr19:2462305-2462306).

На рис. 3 приведены координаты дифференциально метилированных CpG, названия генов (при наличии), к которым относятся CpG, а также направление изменения их метилирования у резистентных сублиний по сравнению с контрольными.

Обсуждение

Ранее мы показали, что ко-культтивирование клеток эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7 с тамоксифен-резистентными клет-

ген	координаты GRCh37/hg19	
PRKCZ	chr1:2036833-2036834	
CRTAC1	chr10:99734998-99734999	
RP11-495K9.9	chr12:132107115-132107116	
	chr 19: 2462305-2462306	метилирование снизилось
CRTAC1	chr10:99734891-99734892	
	chr 11: 1858802-1858803	
	chr14:102026722-102026723	
C2CD4A	chr15:62360801-62360802	
ASIC2	chr17:31620119-31620120	
ZNF787	chr19:56609978-56609979	
	chr2:130344496-130344497	
AC010145.4	chr 2: 16154295-16154296	
	chr 2: 52799788-52799789	
	chr4:1040977-1040978	
	chr7:101361449-101361450	
TRAPPC9	chr8:141109628-141109629	
TRAPPC9	chr8:141109651-141109652	
TRAPPC9	chr8:141109655-141109656	
TRAPPC9	chr8:141109686-141109687	метилирование повысилось

Рис. 3. Координаты дифференциальном метилированных CpG в резистентных линиях и изменение их метилирования

ками MCF-7/T приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 [20]. В дальнейших исследованиях было продемонстрировано непосредственное участие экзосом в подобном горизонтальном пути распространения резистентности [16]. Для ответа на вопрос, в какой мере горизонтальный путь развития резистентности воспроизводит основные характеристики первично-резистентных клеток, был проведен анализ общего уровня метилирования ДНК в чувствительных и резистентных клетках MCF-7.

Дифференциальное изменение метилирования было обнаружено для участков ДНК, регулирующих экспрессию шести белок-кодирующих генов: PRKCZ, TRAPPC9, ASIC2, C2CD4a, ZNF787, CRTAC1. Ген CRTAC1 даже дважды попал в этот список, поскольку направление изменения метилирования у двух соседних динуклеотидов (на расстоянии 100 bp) различалось (гипо- и гиперметилирование). Общие паттерны дифференциального метилирования динуклеотидов CpG во всех шести сублиниях свидетельствуют о необходимости дальнейшего исследования потенциальной значимости этого набора генов при развитии резистентности к тамоксифену, в том числе с помощью экзосом.

Для трех генов из приведенного списка, C2CD4a, ZNF787, CRTAC1, не удалось обнаружить какой-либо возможной связи с РМЖ или с развитием каких-либо опухолей в целом. Стоит отметить, что про функцию этих генов известно довольно мало. Однако для трех других генов существуют определенные доказательства участия в регуляции опухолевой прогрессии.

Так, ген ASIC2 (acid sensing ion channel subunit 2) кодирует кислотно-чувствительный ионный канал, принадлежащий к суперсемейству дегенеринов/эпителиальных натриевых каналов (DEG / ENaC) [21, 22]. В работе [23] была показана связь ASIC2

с развитием и метастазированием колоректального рака (CRC) за счет активации сигнального пути calcineurin/NFAT1 в условиях ацидоза [23]. По данным Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108684-ASIC2/pathology>), мРНК и белок ASIC2 определяются в линиях клеток РМЖ. За тканеспецифичную экспрессию гена ASIC2 отвечают, по данным GeneHancer, 92 энхансерных элемента. Координаты дифференциально метилированного динуклеотида CpG: 17:31620119-31620120 относятся к дистальной части последовательности внутригенного энхансера, GH17J033292 (chr17:31619018-31620430 (GRCh37/hg19)). Помимо ASIC2 данный энхансер регулирует экспрессию GC17P033138 и GC17M033432, и сам регулируется следующими транскрипционными факторами: GLIS2, ZIC2, ZBTB8A, PRDM10, CTCF, PATZ1, KLF9, ZBTB48, ZBTB26, ZFHX2, SIN3A, ZNF660, ZNF335, EGR2.

Ген PRKCZ (протеинкиназа С Zeta) кодирует атипичную протеинкиназу семейства серин/треониновых киназ РКС, которые участвуют в различных клеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка и секреция. В отличие от классических изоферментов РКС, PRKCZ имеет единственный домен типа цинковых пальцев. Функциональная активность PRKCZ включает реорганизацию микротрубочек цитоскелета, позитивную регуляцию адгезии к внеклеточному матриксу, фосфорилирование белков, участие в воспалительном ответе, в том числе NF-κB – одного из негативных регуляторов ER. CpG с дифференциальным метилированием в резистентных к тамоксифену сублиниях был обнаружен в 4-м инtronе из 17 (1:2036833-2036834) и относится к последовательности внутригенного энхансера GH17J002104, контролирующего экспрессию 7 генов: помимо PRKCZ, это SKI (протоонкоген SKI), ANKRD65 (домен повторения Ankyrin 65), FAAP20

(белок 20, связанный с комплексом FA), РНК-гены ENSG00000271806 и lncRNAs GC01M002070 и GC01M002102.

Еще один дифференциально метилированный ген TRAPPC9 (Trafficking Protein Particle Complex Subunit 9) кодирует субъединицу транспортного комплекса TRAPP, являющегося одним из позитивных регуляторов NF-кВ [24, 25]. Интересно, что подавление экспрессии TRAPPC9 ослабляет пролиферацию, инвазию, миграцию, образование колоний и рост ксеногraftов для клеточной линии РМЖ MDA-MB-231 [25]. Участие TRAPPC9 в регуляции сигналинга NF-кВ и в онкогенезе было в дальнейшем подтверждено еще в нескольких работах [25–27].

Следует отметить, что полученные нами данные расширяют и дополняют спектр генов, метилирование которых коррелирует с развитием гормональной резистентности. Так, судя по известным литературным данным, изменения метилирования ДНК, сопровождающие развитие гормональной резистентности, представляют собой достаточно вариабельный процесс и могут охватывать широкий спектр генов в каждом отдельном случае [28, 29]. Какие из этих изменений являются ведущими, необходимыми и достаточными для развития резистентности – именно для ответа на этот вопрос было выполнено настоящее исследование на трех различных моделях резистентности, результатом которого явилась идентификация общих паттернов метилирования ДНК, ассоциированных с формированием резистентного фенотипа клеток.

Анализируя вопрос об эпигенетических факторах, участвующих в формировании гормональной резистентности, нельзя не отметить микроРНК как класс биологически активных соединений, чью роль в развитии и поддержании резистентности трудно переоценить. Среди них: mir-27, mir-181, mir-221/222, mir-21, mir-101 и ряд других, обладающих широким спектром действия, в первую

очередь на PI3K/Akt/mTOR сигнальный путь, и непосредственно участвующих в развитии и поддержании гормональной резистентности [30–33]. Активно разрабатываются и диагностические тесты на определение гормональной зависимости опухолей, включающие сигнатуру из нескольких видов микроРНК [34, 35]. Необходимо подчеркнуть, что изменения спектра микроРНК и профиля метилирования ДНК являются, несомненно, взаимосвязанными процессами: как экспрессия микроРНК может регулироваться через метилирование промоторных участков кодирующих генов (как в случае mir-27, одного из негативных регуляторов PI3K/Akt/mTOR пути) [36], так и сами микроРНК регулируют экспрессию генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы – эффект, в частности, продемонстрированный для mir-29 [37].

В целом комплексную эпигенетическую регуляцию генома, включающую метилирование ДНК, эффекты малых некодирующих РНК и, вероятно, целый ряд других, пока малоисследованных механизмов, можно рассматривать в качестве ведущих факторов, определяющих формирование и закрепление резистентного фенотипа опухолевых клеток.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о существовании общих паттернов ДНК, метилирование которых изменяется в одном направлении и в клетках с первичной резистентностью, и в клетках с вторичной резистентностью, развившейся как в результате совместного культивирования чувствительных клеток с резистентными, так и при действии экзосом. Из шести дифференциально метилированных генов, ассоциированных с развитием устойчивости к тамоксифену, два гена напрямую вовлечены в регуляцию активности NF-кВ, что может свидетельствовать о ключевой роли NF-кВ-сигналинга в формировании резистентного фенотипа, в том числе в условиях горизонтального переноса резистентности.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Pineros M., Znaor A., Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15; 144(8): 1941–1953. doi: 10.1002/ijc.31937.
2. Meric-Bernstam F. Heterogenic loss of BRCA in breast cancer: the «two-hits» hypothesis takes a hit. *Ann Surg Oncol*. 2007. 14(9): 2428–2429. doi: 10.1245/s10434-007-9379-7.
3. Di Cosimo S., Baselga J. Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. [corrected]. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Mar; 7(3): 139–47. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.234.
4. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bouanova G., Weeber F., Balgobind A.V., Wind K., Gracanin A., Begthel H., Korving J., van Boxtel R., Duarte A.A., Lelieveld D., van Hoeck A., Ernst R.F., Blokzijl F., Nijman I.J., Hoogstraat M., van de Ven M., Egan D.A., Zinzalla V., Moll J., Boj S.F., Voest E.E., Wessels L., van Diest P.J., Rottenberg S., Vries R.G.J., Cuppen E., Clevers H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*. 2018 Jan 11; 172(1–2): 373–386.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010.
5. Keller R.R., Gunther E.J. Evolution of Relapse-Proficient Subclones Constrained by Collateral Sensitivity to Oncogene Overdose in Wnt-Driven Mammary Cancer. *Cell Rep*. 2019 Jan 22; 26(4): 893–905. e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.096.
6. Condorelli R., Spring L., O'Shaughnessy J., Lacroix L., Bailleux C., Scott V., Dubois J., Nagy R.J., Lanman R.B., Lafrate A.J., Andre F., Bardia A. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018 Mar 1; 29(3): 640–645. doi: 10.1093/annonc/mdx784.
7. Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews. Genetics*. 2006. 7(1): 21–33. doi: 10.1038/nrg1748.
8. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001. 29(14): 2905–2919. doi: 10.1093/nar/29.14.2905.
9. Safe S., Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2008 Nov; 41(5): 263–75. doi: 10.1677/JME-08-0103.
10. Schiff R., Reddy P., Ahotupa M., Coronado-Heinsohn E., Grim M., Hilsenbeck S.G., Lawrence R., Deneke S., Herrera R., Chamness G.C., Fuqua S.A., Brown P.H., Osborne C.K. Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors *in vivo*. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Dec 6; 92(23): 1926–34. doi: 10.1093/jnci/92.23.1926.
11. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Eppenberger U., Benz C.C. The NFκappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jul; 12 Suppl 1: S37–46. doi: 10.1677/erc.1.00977.
12. Ji Z., He L., Regev A., Struhl K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF-кB, STAT3, and AP-1 factors is involved

- in many human cancers. Proc Natl Acad Sci USA. 2019 May 7; 116(19): 9453–9462. doi: 10.1073/pnas.1821068116.
13. Scherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A., Krasil'nikov M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. J Cell Biochem. 2012 Jun; 113(6): 2147–55. doi: 10.1002/jcb.24087.
 14. Stone A., Zotenko E., Locke W.J., Korbie D., Millar E.K., Pidsley R., Stirzaker C., Graham P., Trau M., Musgrave E.A., Nicholson R.I., Gee J.M., Clark S.J. DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer. Nat Commun. 2015 Jul 14; 6: 7758. doi: 10.1038/ncomms8758.
 15. Trimarchi M.P., Mouangasavan M., Huang T.H. Cancer epigenetics: a perspective on the role of DNA methylation in acquired endocrine resistance. Chin J Cancer. 2011 Nov; 30(11): 749–56. doi: 10.5732/cjc.011.10128.
 16. Semina S.E., Scherbakov A.M., Vnukova A.A., Bagrov D.V., Evrushenko E.G., Safranova V.M., Golovina D.A., Lyubchenko L.N., Gudkova M.V., Krasil'nikov M.A. Exosome-Mediated Transfer of Cancer Cell Resistance to Antiestrogen Drugs. Molecules. 2018; 23(4). pii: E829. doi: 10.3390/molecules23040829.
 17. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B., Rudenko V.V., Karandasheva K.O., Nemtsova M.V., Izhevskaya V.L., Simonova O.A., Larin S.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by Xmal-reduced representation bisulfite sequencing. Epigenomics. 2017; 9(6): 833–847. doi: 10.2217/epi-2017-0031.
 18. Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Ignatova E.O., Simonova O.A., Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Larin S.S., Poddubskaya E.V., Trotsenko I.D., Rudenko V.V., Karandasheva K.O., Petrova K.D., Tsyanov M.M., Deryusheva I.V., Kazantseva P.V., Doroshenko A.V., Tarabavanskaya N.A., Chesnokova G.G., Sekacheva M.I., Nemtsova M.V., Izhevskaya V.L., Kutsev S.I., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Genome-wide methylotyping resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives. Epigenomics. 2019 May; 11(6): 605–617. doi: 10.2217/epi-2018-0213.
 19. Krueger F., Andrews S.R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. Bioinformatics. 2011. 27(11): 1571–1572. doi: 10.1093/bioinformatics/btr167.
 20. Semina S.E., Scherbakov A.M., Kovalev S.V., Shevchenko V.E., Krasil'nikov M.A. Horizontal Transfer of Tamoxifen Resistance in MCF-7 Cell Derivatives: Proteome Study. Cancer Invest. 2017 Sep 14; 35(8): 506–518. doi: 10.1080/07357907.2017.1368081.
 21. Orr B.O., Gorczyca D., Younger M.A., Jan L.Y., Jan Y.N., Davis G.W. Composition and Control of a Deg/ENaC Channel during Presynaptic Homeostatic Plasticity. Cell Rep. 2017 Aug 22; 20(8): 1855–1866. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.074.
 22. Walz W. pH shifts evoked by neuronal stimulation in slices of rat hippocampus. Canad J Physiol Pharmacol. 1989; 67(6): 577–581. doi: 10.1139/y89-092.
 23. Zhou Z.H., Song J.W., Li W., Liu X., Cao L., Wan L.M., Tan Y.X., Ji S.P., Liang Y.M., Gong F. The acid-sensing ion channel, ASIC2, promotes invasion and metastasis of colorectal cancer under acidosis by activating the calcineurin/NFAT1 axis. J Exp Clin Cancer Res. 2017 Sep 19; 36(1): 130. doi: 10.1186/s13046-017-0599-9.
 24. Hu W.H., Pendergast J.S., Mo X.M., Brambilla R., Bracchi-Ricard V., Li F., Walters W.M., Blits B., He L., Schaal S.M., Bethea J.R. NIBP, a novel NIK and IKK(beta)-binding protein that enhances NF-(kappa)B activation. J Biol Chem. 2005; 280(32): 29233–29241. 10.1074/jbc.M501670200.
 25. Zhang Y., Liu S., Wang H., Yang W., Li F., Yang F., Yu D., Ramsey F.V., Tuszyński G.P., Hu W. Elevated NIBP/TRAPPc9 mediates tumorigenesis of cancer cells through NFkappaB signaling. Oncotarget. 2015. 6(8): 6160–6178. doi: 10.18632/oncotarget.3349.
 26. Qin M., Zhang J., Xu C., Peng P., Tan L., Liu S., Huang J. Knockdown of NIK and IKKbeta-Binding Protein (NIBP) Reduces Colorectal Cancer Metastasis through Down-Regulation of the Canonical NF-kappa-Beta Signaling Pathway and Suppression of MAPK Signaling Mediated through ERK and JNK. PLoS One. 2017 Jan 26; 12(1): e0170595. doi: 10.1371/journal.pone.0170595.
 27. Fu Z.H., Liu S.Q., Qin M.B., Huang J.A., Xu C.Y., Wu W.H., Zhu L.Y., Qin N., Lai M.Y. NIK and IKKbeta-binding protein contributes to gastric cancer chemoresistance by promoting epithelialmesenchymal transition through the NFkappaB signaling pathway. Oncol Rep. 2018 Jun; 39(6): 2721–2730. doi: 10.3892/or.2018.6348.
 28. Ariazi E.A., Taylor J.C., Black M.A., Nicolas E., Slifker M.J., Azzam D.J., Boyd J. A New Role for ERalpha: Silencing via DNA Methylation of Basal, Stem Cell, and EMT Genes. Mol Cancer Res. 2017 Feb; 15(2): 152–164. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0283.
 29. Lin X., Li J., Yin G., Zhao Q., Elias D., Lykkesfeldt A.E., Stenvang J., Brunner N., Wang J., Yang H., Bolund L., Ditzel H.J. Integrative analyses of gene expression and DNA methylation profiles in breast cancer cell line models of tamoxifen-resistance indicate a potential role of cells with stem-like properties. Breast Cancer Res. 2013 Dec 19; 15(6): R119. doi: 10.1186/bcr3588.
 30. Ding L., Ni J., Yang F., Huang L., Deng H., Wu Y., Ding X., Tang J. Promising therapeutic role of miR-27b in tumor. Tumour Biol. 2017 Mar; 39(3): 1010428317691657. doi: 10.1177/1010428317691657.
 31. Zhuang L., Qu H., Cong J., Dai H., Liu X. MiR-181c affects estrogen-dependent endometrial carcinoma cell growth by targeting PTEN. Endocr J. 2019 Jun 28; 66(6): 523–533. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0538.
 32. Chanyshев M.D., Razumova Y.V., Ovchinnikov V.Y., Gulyaeva L.F. MiR-21 regulates the ACAT1 gene in MCF-7 cells. Life Sci. 2018 Sep 15; 209: 173–178. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.010.
 33. Sachdeva M., Wu H., Ru P., Hwang L., Trieu V., Mo Y.Y. MicroRNA-101-mediated Akt activation and estrogen-independent growth. Oncogene. 2011 Feb 17; 30(7): 822–31. doi: 10.1038/onc.2010.463.
 34. Miller P.C., Clarke J., Koru-Sengul T., Brinkman J., El-Ashry D. A novel MAPK-microRNA signature is predictive of hormone-therapy resistance and poor outcome in ER-positive breast cancer. Clin Cancer Res. 2015 Jan 15; 21(2): 373–85. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2053.
 35. Egeland N.G., Lunde S., Jonsdottir K., Lende T.H., Cronin-Fenton D., Gilje B., Janssen E.A., Soiland H. The Role of MicroRNAs As Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients. Int J Mol Sci. 2015 Oct 14; 16(10): 24243–75. doi: 10.3390/ijms161024243.
 36. Li X., Wu Y., Liu A., Tang X. MiR-27b is epigenetically downregulated in tamoxifen resistant breast cancer cells due to promoter methylation and regulates tamoxifen sensitivity by targeting HMGB3. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 2; 477(4): 768–773. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.133.
 37. Hysoli E., Tanaka Y., Su J., Kim K.Y., Zhong T., Janknecht R., Zhou X.L., Geng L., Qiu C., Pan X., Jung Y.W., Cheng J., Lu J., Zhong M., Weissman S.M., Park I.H. Regulation of the DNA Methylation Landscape in Human Somatic Cell Reprogramming by the miR-29 Family. Stem Cell Reports. 2016 Jul 12; 7(1): 43–54. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.05.014.

Поступила/Received 13.05.19
Принята в печать/Accepted 11.06.19

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Андреева Ольга Евгеньевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, Россия). E-mail: tilberta@gmail.com. SPIN-код: 3607-9431. AuthorID (РИНЦ): 745734. ORCID: 0000-0002-6015-6619. Researcher ID (WOS): K-1304-2015. Author ID (Scopus): 37015258000.
- Сигин Владимир Олегович**, младший научный сотрудник, Медико-генетический научный центр (г. Москва, Россия). E-mail: sigin.vladimir@gmail.com. SPIN-код: 9156-3209. AuthorID (РИНЦ): 974871.
- Стрельников Владимир Викторович**, доктор биологических наук, доцент, Медико-генетический научный центр, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, Россия). E-mail: vstrel@yandex.ru. SPIN-код: 9118-7267. AuthorID (РИНЦ): 97849. ORCID: 0000-0001-9283-902X. Researcher ID (WOS): D-1576-2012. Author ID (Scopus): 6603557133.
- Танас Александр Сергеевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Медико-генетический научный центр, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, Россия). SPIN-код: 2947-7067 AuthorID (РИНЦ): 619620. ORCID: 0000-0002-2177-6743. Researcher ID (WOS): D-2145-2012. Author ID (Scopus): 36006579000.

Щербаков Александр Михайлович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, Россия). E-mail: alex.scherbakov@gmail.com. SPIN-код: 9526-0047. AuthorID (РИНЦ): 136087. ORCID: 0000-0002-2974-9555. Researcher ID (WOS): F-4914-2013. Author ID (Scopus): 7003636718.

Красильников Михаил Александрович, доктор биологических наук, профессор, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, Россия). SPIN-код: 3881-0919. AuthorID (РИНЦ): 80070. ORCID: 0000-0002-5902-7633. Researcher ID (WOS): R-6938-2019. Author ID (Scopus): 7005790120.

Финансирование

Работа финансировалась из средств гранта Российского научного фонда № 17-75-10212 (Анализ метилирования ДНК) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-09016\18 (Получение и исследование активности препаратов экзосом).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Olga E. Andreeva, PhD, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). E-mail: tilberta@gmail.com. ORCID: 0000-0002-6015-6619. Researcher ID (WOS): K-1304-2015. Author ID (Scopus): 37015258000.

Vladimir O. Sigin, Junior Researcher, Research Centre for Medical Genetics (Moscow, Russia).

Vladimir V. Strelnikov, PhD, DSc, Research Centre for Medical Genetics, Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0001-9283-902X. Researcher ID (WOS): D-1576-2012. Author ID (Scopus): 6603557133.

Alexander S. Tanas, PhD, Senior Researcher, Research Centre for Medical Genetics, Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-2177-6743. Researcher ID (WOS): D-2145-2012. Author ID (Scopus): 36006579000.

Alexander M. Scherbakov, PhD, Senior Researcher, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-2974-9555. Researcher ID (WOS): F-4914-2013. Author ID (Scopus): 7003636718.

Mikhail A. Krasilnikov, PhD, DSc, Professor, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-5902-7633. Researcher ID (WOS): R-6938-2019. Author ID (Scopus): 7005790120.

Funding

The study was supported by Russian Scientific Foundation No. 17-75-10212 (the analysis of DNA methylation) and by RFBR (Russian Foundation for Basic Research) No. 18-29-09016\18 (isolation and study of exosomes).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.