

УДК 577.218

Псевдоген *PTENP1*, в отличие от гена *PTEN*, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста

Т. Ф. Коваленко¹, К. В. Морозова², Л. А. Озолина², И. А. Лапина², Л. И. Патрушев^{1*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*E-mail: patrush@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 09.03.2017

Принята к печати 03.10.2017

РЕФЕРАТ Опухолевый супрессор *PTEN* контролирует многие клеточные функции, включая клеточный цикл, апоптоз, старение, транскрипцию и трансляцию мРНК многих генов. В клетках различных опухолей *PTEN* часто инактивируется генетическими мутациями и эпимутациями. В данной работе изучено метилирование гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1* как возможного генетического маркера гиперплазий (ГЭ) и рака (РЭ) эндометрия. Метилирование 5'-концевых участков *PTEN* и *PTENP1* анализировали с помощью метилчувствительной ПЦР в геномной ДНК, выделенной из тканей 57 злокачественных опухолей и 43 гиперплазий эндометрия, нормальных тканей 24 женщин в возрасте 17–34 лет и 19 женщин в возрасте 45–65 лет, а также из 20 образцов периферической венозной крови больных РЭ. Установлено, что ни в одном из образцов ДНК ген *PTEN* не был метилирован. В отличие от этого, метилирование псевдогена *PTENP1* обнаружено во всех исследованных тканях, кроме периферической крови. Сравнение частот метилирования *PTENP1* в группах РЭ и ГЭ и в контрольной группе женщин среднего и пожилого возраста (СПВ) не выявило статистически значимых различий между ними ($0.80 < p < 0.50$). Во всех этих группах выявлен высокий уровень метилирования (71–77% у пациенток против 58% в контрольной группе). При этом обнаружены значимые различия в частотах метилирования *PTENP1* в нормальной эндометрии молодых (4%) и СПВ (58%) женщин ($p < 0.001$). Сделан вывод, что метилирование псевдогена *PTENP1* может отражать возрастные изменения и не имеет прямой связи с исследуемой патологией эндометрия. Предполагается, что в зависимости от влияния метилированного *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN* метилирование псевдогена может защищать организм от развития РЭ и/или служить маркером предракового состояния клеток эндометрия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гиперплазия эндометрия, длинные некодирующие РНК, метилирование ДНК, рак эндометрия, *PTEN*, *PTENP1*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГЭ – гиперплазия эндометрия; РЭ – рак эндометрия; днРНК – длинные некодирующие РНК; кэРНК – конкурирующая эндогенная РНК; миРНК – микроРНК; СПВ – средний (45–55 лет) и пожилой (старше 55 лет) возраст; сРНК – смысловая РНК; асРНК – антисмысловая РНК; MRE – microRNA recognition element (элемент, узнающий микроРНК); PICS – *PTEN*-loss-induced cellular senescence (клеточное старение, индуцированное потерей *PTEN*); *PTEN* – phosphatase and tensin homolog (гомолог фосфатазы и тензина).

ВВЕДЕНИЕ

Рак эндометрия (РЭ) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний женских половых путей, частота которого составляет 4.8% от всех онкопатологий у женщин [1]. Вероятность возникновения РЭ увеличивается с возрастом: к 75 годам кумулятивные риски заболевания достигают 1%, а смерти – 0.2%. Хотя РЭ рассматривается как постменопаузальное заболевание, которое развивается у женщин старше 50 лет, до 14% клинических случаев РЭ диагностируется в пременопаузе, и из них только 5% у женщин моложе 40 лет [2–4]. Распространение ожирения и метаболического синдрома в популяциях Европы и Северной Америки, сопровождающиеся повышением уровня эндогенных эстрогенов, а также общее старение населения этих стран позволяет предполагать значительное возрастание инцидентов заболевания в этих регионах в ближайшем будущем [5]. Все это диктует необходимость исследования этиологии, а также поиска биомаркеров ранней диагностики РЭ с целью его предупреждения и проведения своевременного адекватного лечения.

В зависимости от сферы применения в медицине биомаркеры принято разделять на прогностические, предиктивные и фармакодинамические [6]. Биомаркеры первого типа используют для оценки тяжести заболевания и выживаемости пациентов независимо от проводимого лечения. Предиктивные биомаркеры позволяют предсказывать реакцию больных на проводимое лечение, а фармакодинамические – индивидуальный ответ пациента на воздействие лекарственных препаратов с учетом генетических особенностей молекулярных мишеней используемых лекарств, а также ферментов их метаболизма.

На основе биомаркеров РЭ традиционно разделяют на два подтипа [1, 7–9]. Наиболее часто встречающийся и, как правило, спорадически возникающий РЭ типа I, обычно характеризуется наличием высококодифференцированных клеток, по гистологическим характеристикам является эндометриоидным, а сами клетки опухоли обнаруживают нормальный диплоидный кариотип, нестабильность микросателлитов (MSI) и экспрессируют рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR). При РЭ типа I мутации в гене опухолевого супрессора TP53 происходят редко, и больные имеют хорошие шансы на выздоровление. В отличие от этого, РЭ типа II не относится к эндометриоидным опухолям, содержит низкодифференцированные клетки, для многих из которых характерна анеуплоидия, отсутствуют генетические изменения в белке p53, а ER и PR не экспрессируются. При этом течение болезни имеет неблагоприятный прогноз.

Данные гистологического и молекулярно-генетического анализа позволяют разделить РЭ типа II на несколько дополнительных подтипов, в том числе серозный и светлоклеточный РЭ, а также сарциносаркому [1]. Проведенный недавно с использованием глубокого секвенирования геномной ДНК метаанализ мутаций в опухолях эндометрия выявил также значительную гетерогенность их мутационных спектров и позволил разделить РЭ на четыре группы [7].

Одним из факторов риска развития РЭ являются гиперпластические процессы в эндометрии, которые происходят на фоне дисбаланса эндогенных стероидных гормонов: эстрогенов и прогестерона [10–12]. ГЭ отличает избыточная пролиферация клеток, сопровождаемая характерными морфологическими изменениями ткани. По классификации ВОЗ 94 в гиперплазии эндометрия выделяют ГЭ без атипии и ГЭ с атипией, которые, в свою очередь, делятся на простые и комплексные [10, 11]. Своевременно выявленные ГЭ обычно хорошо отвечают на терапию. Тем не менее комплексные ГЭ без атипии и с атипией трансформируются в РЭ приблизительно в 25 и 50% случаев соответственно [13]. Как при раке, так и при гиперплазии в разной степени нарушен контроль пролиферации клеток, что сопровождается увеличением числа клеток в единице объема ткани.

Клетки РЭ гораздо чаще содержат мутации в генах сигнального пути PI3K/AKT, чем клетки опухолей других типов [7, 14]. Серин-треониновая протеинкиназа AKT регулирует многие клеточные функции [15]. Важнейшим негативным регулятором передачи сигналов по этому пути является фосфатаза двойной специфичности PTEN. Мутации в гене *PTEN*, расположенном на хромосоме 10q23.3, часто обнаруживают при ГЭ и в 93% случаев РЭ. Основной субстрат PTEN – вторичный посредник фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат (PIP3), под действием PTEN утрачивает 3'-фосфатную группу, превращаясь в PIP2. Дефосфорилированный PIP2 теряет способность активировать AKT, что блокирует передачу сигнала по этому пути и подавляет многие клеточные активности и функции, включая прохождение по клеточному циклу, апоптоз, подвижность и поляриность клеток, их старение, самообновление стволовых клеток, процессы транскрипции и трансляции. Для проявления супрессорных свойств PTEN важна его альтернативная протеинфосфатазная активность, вовлеченная в дефосфорилирование проапоптотических белков, протеинкиназ и факторов транскрипции [15–17]. Недавно обнаружили внеклеточные и внутриклеточные супрессорные функции PTEN, независимые от его фосфатазной активности [18]. Все это указывает на PTEN как на важный прогностический и предиктивный биомаркер канцерогенеза [19], а также

освещает молекулярные механизмы участия *PTEN* в этиологии РЭ и подчеркивает необходимость изучения регуляции его активности в норме и при РЭ.

В нормальных тканях ген *PTEN* экспрессируется конститутивно, и его функции строго контролируются [17, 20]. Активность *PTEN* регулируется на всех уровнях его экспрессии: путем активации и подавления транскрипции [21–23], посттранскрипционно на уровне мРНК с участием многочисленных микроРНК [24, 25], а также на посттрансляционном уровне посредством ковалентных модификаций белкового продукта и взаимодействий с многочисленными мембранными, цитоплазматическими и ядерными белками [20]. Как позитивный, так и негативный контроль транскрипции гена *PTEN* происходит с участием нескольких факторов транскрипции, а в подавление транскрипции вовлечены эпигенетические механизмы. В последнем случае имеет место метилирование промоторных участков ДНК гена *PTEN*, а также деацетилирование гистонов хроматина на промоторе. Таким образом, имеющиеся данные показывают, что инактивация гена опухолевого супрессора *PTEN*, ассоциированная с прогрессией опухолей при ГЭ и РЭ, может происходить под действием как генетических, так и эпигенетических мутаций.

Процессированный (не содержащий интронов) псевдоген *PTENP1*, расположенный на хромосоме 9p13.3, на 98.6% гомологичен функциональному гену *PTEN*, однако не экспрессирует белок *PTEN* из-за потери кодона инициации трансляции в результате мутации [26]. *PTENP1*, как правило, транскрибируется с образованием трех длинных некодирующих РНК (днРНК) – одной смысловой (сРНК) и двух антисмысловых (асРНК) α и β [27]. Транскрипция происходит с двух разнонаправленных, перекрывающихся промоторов, и образующиеся транскрипты выполняют важные регуляторные функции: сРНК проявляет в клетке свойства конкурирующей эндогенной РНК (кэРНК) [28–30]. В соответствии с этим механизмом, сайты связывания микроРНК (миРНК) MRE, локализованные на сРНК псевдогена, конкурируют с MRE мРНК гена *PTEN* за взаимодействующие с ними специфические миРНК, препятствуя их ингибирующему действию на трансляцию *PTEN*-мРНК. В том же направлении действует и полиаденилированная асРНК- β . Она взаимодействует с 5'-концом неполиаденилированной *PTENP1*-сРНК и стабилизирует ее, обеспечивая более эффективное конкурирующее действие последней. В отличие от этого, асРНК- α обеспечивает доставку по крайней мере двух белков, участвующих в перестройке хроматина – ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) и Zeste-энхансера (EZH2), к промотору гена *PTEN* [27]. Эти белки обеспечивают тримети-

лирование гистона H3 по остатку Lys27 (H3K27me3), маркеру неактивного хроматина с подавленной транскрипцией. Разнонаправленное действие транскриптов псевдогена *PTENP1* на экспрессию гена опухолевого супрессора *PTEN* предполагает необходимость тонкой регуляции их соотношения в клетке. Механизмы такой регуляции, которые могут быть нарушены в опухолях, не изучены. Делеции псевдогена *PTENP1* обнаружены в спорадических опухолях прямой кишки [28], а также при первичной и метастатической меланоме [31]. Другой возможный механизм инактивации псевдогена *PTENP1* путем метилирования его промоторной области выявлен при раке легкого [32], а недавно в опухолях светлоклеточного рака почки [33].

Ранее мы впервые обнаружили метилирование 5'-концевой промоторной области псевдогена *PTENP1* при РЭ и ГЭ [34]. В настоящей работе метилирование *PTENP1* при РЭ и ГЭ было изучено более детально, а также впервые выявлено метилирование исследуемой области псевдогена в клетках нормального эндометрия женщин среднего и пожилого возраста (СПВ). Кроме того, проанализирован статус метилирования областей промотора гена *PTEN*, не изученных ранее при РЭ и ГЭ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты и образцы тканей

В работе использовали образцы тканей 143 пациентов Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, а также московских клинических больниц № 4 и 55. В исследование были включены образцы тканей 57 больных РЭ (средний возраст 61.9 ± 7.8 лет) и 43 пациенток с простой гиперплазией эндометрия (средний возраст 52.1 ± 6.5 лет). Кроме того, исследовали периферическую венозную кровь 20 больных РЭ из основной группы (средний возраст 57.1 ± 7.6 лет), у которых обнаружено метилирование *PTENP1* в эндометрии. Контрольную группу составили 43 женщины с гистологически неизменным эндометрием, проходившие обследование в связи с подозрением на предраковое состояние эндометрия. Данная группа включала две подгруппы: 24 женщины в возрасте от 17 до 34 лет (средний возраст 24.2 ± 4.8 лет) и 19 женщин в возрасте от 45 до 65 лет (средний возраст 52.5 ± 6.0 лет). Сравнение среднего возраста контрольной подгруппы (45–65 лет) и группы больных РЭ (57 человек) с использованием критерия Манна–Уитни выявило статистически значимые различия ($p < 0.05$). Поэтому при сравнении метилирования псевдогена *PTENP1* из группы больных РЭ были исключены женщины старше 59 лет и выделена подгруппа из 24 больных (48–59 лет, средний

возраст – 54.3 ± 3.4 лет), которая по этому признаку не отличалась от контрольной подгруппы ($p = 0.095$). Использовали как свежемороженые ткани, полученные во время операций или при взятии биопсии, так и образцы, фиксированные формалином и заключенные в парафиновые блоки. Периферическую венозную кровь брали путем пункции локтевой вены. В качестве антикоагулянта добавляли 3.8% раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 9. Стадии РЭ классифицировали в соответствии с рекомендациями Международной федерации акушерства и гинекологии (FIGO). Гистологический тип РЭ определяли в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения. Согласие на обработку данных получено от всех пациенток, включенных в исследование.

Выделение ДНК и ее бисульфитная конверсия

Геномную ДНК выделяли стандартным методом с применением фенола и гуанидинхлорида [35]. В случае образцов ткани, заключенных в парафиновые блоки, каждый блок измельчали с помощью микротомы до фрагментов толщиной 10 мкм. Далее проводили депарафинизацию образца и экстракцию ДНК согласно методике [36] с незначительными модификациями. Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Бисульфитную конверсию проводили с помощью EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу, предложенному фирмой-производителем.

Метилчувствительная ПЦР

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 67 мМ Трис-НСI (рН 8.8), 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Твин 20, 2 мМ MgCl_2 , четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата (0.2 мМ каждый; «Сибэнзим», Россия), прямой и обратный праймеры (0.5 мкМ каждый), 25 нг конвертированной бисульфитом ДНК и 0.5–1.0 ед. Taq-ДНК-полимеразы. Taq-ДНК-полимеразу получали из рекомбинантного штамма *E. coli* PVG-A1 по методу Патрушева и др. с незначительными модификациями [37]. В качестве полностью метилированного контроля использовали ДНК, выделенную из лимфоцитов крови человека, метилированную *in vitro* с помощью метилазы SssI («Сибэнзим», Россия) и обработанную бисульфитом натрия. Неметилированным контролем служила ДНК лимфоцитов крови, конвертированная бисульфитом натрия. После проведения ПЦР на термоциклере Mastercycler pro (Eppendorf, Германия) продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 3% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали 100 + 50 п.н. ДНК-маркер («Сибэнзим», Россия). Типичный результат,

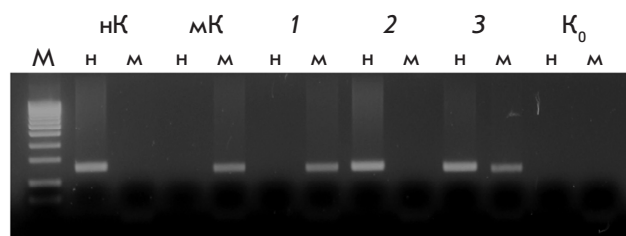


Рис. 1. Анализ статуса метилирования 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* с помощью метилчувствительной ПЦР. н и м – продукт ПЦР-амплификации, образующийся в присутствии праймеров к неметилированной или метилированной матрице соответственно. В качестве матрицы использовали следующие образцы ДНК, подвергнутые бисульфитной конверсии: нК – из периферической крови (неметилированный контроль), мК – из периферической крови, метилированная *in vitro* с помощью метилазы SssI (метилированный контроль), 3 – из разных опухолей, в которых исследуемая область псевдогена метилирована во всех клетках (1), неметилирована во всех клетках (2), метилирована в части клеток (3). K_0 – амплификация в отсутствие ДНК, М – маркер молекулярных масс

полученный с использованием метилчувствительной ПЦР, представлен на рис. 1. Последовательности праймеров, а также условия проведения ПЦР-амплификации с каждой из пар праймеров приведены в табл. 1. С целью исключения неспецифического отжига праймеров для каждой их пары проводили оптимизацию температуры отжига в градиенте температур. Кроме того, для предотвращения появления неспецифических продуктов ПЦР в результате «переамплификации» подбирали оптимальное количество циклов. При анализе 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* использовали праймеры, приведенные в [32]. Участок *PTEN2* промотора гена *PTEN* (рис. 2) анализировали с помощью праймеров, разработанных нами. Статус метилирования локусов *PTEN4* и *PTEN5* анализировали с использованием праймеров [38] и [32] соответственно.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ SPSS v. 22 (SPSS Inc.). Различия в частотах метилирования гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1* в группах оценивали с использованием двухстороннего метода Хи-квадрат и точного критерия Фишера. Статистические различия среднего возраста между группами оценивали с применением критерия Манна–Уитни.

Таблица 1. Праймеры и условия ПЦР, использованные для определения статуса метилирования промоторов гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	T _{отж.} , °C	Число циклов ПЦР	Размер продукта ПЦР, п.н.
<i>PNP1-U-F</i>	5-ТТGТАGТТGТGАТGGAAGТТТGААТ	64	33	156
<i>PNP1-U-R</i>	5'-CCACCCCAАААТАCTCACA			
<i>PNP1-M-F</i>	5-TGТАGTCGТGАТGGAAGТТТGААТ	63	33	152
<i>PNP1-M-R</i>	5'-CCCCCGCAАТАCTCACG			
<i>PN2-U-F</i>	5-ТТGТАGТТАТGАТGGAAGТТТGAG	61	33	165
<i>PN2-U-R</i>	5'-CCACCACCАААССААССА			
<i>PN2-M-F</i>	5-ТТGТАGТТАТGАТGGAAGТТТGAG	61	33	162
<i>PN2-M-R</i>	5'-CGCCGCAААССGACCGA			
<i>PN4-U-F</i>	5-GТТGGGGТGТGТGGAGТТТGGТТ	61	36	135
<i>PN4-U-R</i>	5'-CCCTCAААCTCCAААТCAАТTCААА			
<i>PN4-M-F</i>	5-CGCGCGGAGТТТGGТТTCG	62	32	117
<i>PN4-M-R</i>	5'-CAААТCGАТTCGCGACGTCG			
<i>PN5-U-F</i>	5-TАТТАGТТТGGGATТТТТТТТТТGT	60	36	186
<i>PN5-U-R</i>	5'-CCCAACCCTTCCTACACCACA			
<i>PN5-M-F</i>	5-GТТТGGGGATТТТТТТТТTCGC	60	36	178
<i>PN5-M-R</i>	5'-AACCTTCCTACGCCGCG			

Примечание. М – метилированный; U – неметилированный; F – прямой праймер; R – обратный праймер; *PNP* – праймеры для амплификации участков псевдогена; *PN* – праймеры для амплификации участков гена *PTEN*.

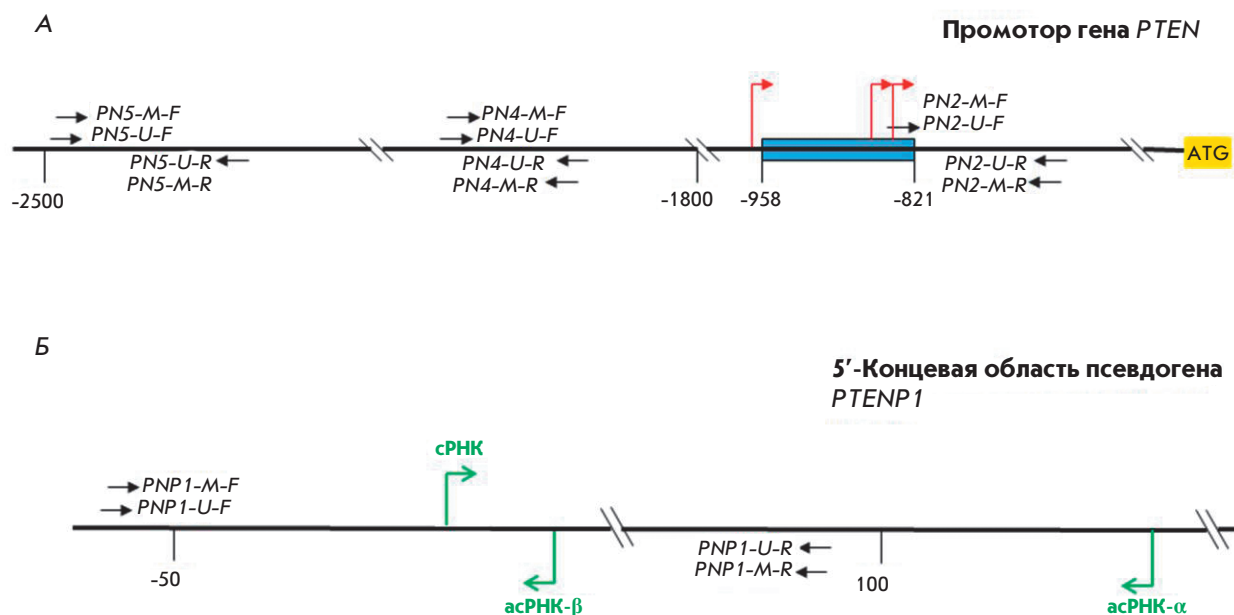


Рис. 2. Исследованные участки гена *PTEN* (А) и псевдогена *PTENP1* (Б). Голубым прямоугольником обозначена область минимального промотора гена *PTEN*; загнутые красные и зеленые стрелки обозначают точки инициации транскрипции *PTEN* и *PTENP1* соответственно; черные разнонаправленные стрелки обозначают положение праймеров для ПЦР; *сРНК* – смысловая РНК, *асРНК-α* и *-β* – антисмысловые РНК- α и $-β$, цифры указывают на расстояние от ATG-кодона (А) или от точки инициации синтеза *сРНК* (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе нами исследованы три участка в окрестностях минимального промотора гена *PTEN*, которые включают потенциально метилируемые CpG-последовательности, ранее не анализированные при РЭ (рис. 2). Последовательность, фланкированная праймерами *PN2*, располагается на 685 п.н. выше АТG-кодона и примыкает непосредственно к минимальному промотору. Область между праймерами *PN4* расположена на 1913 п.н. выше АТG-кодона. Метилирование данного участка изучали при меланоме [38]. Последовательность, локализованная между праймерами *PN5*, метилирование которой уже изучено при раке легкого, располагается на 2300 п.н. выше АТG-кодона [32].

Начиная работу, мы прежде всего установили, что ни в одном из образцов ДНК, выделенных из анализируемых тканей, включая РЭ, ГЭ и нормальный эндометрий, ген *PTEN* в изучаемых областях промотора не метилирован (табл. 2). Хотя это не исключало наличия в нем генетических мутаций, однако указывало на то, что у наших пациенток ген не мог быть инактивирован с помощью такого эпигенетического механизма. Поэтому в соответствии с опубликованными данными, мы предположили, что инактивация *PTEN* могла осуществляться по известному механизму кЭРНК через подавление транскрипции псевдогена *PTENP1* путем метилирования его 5'-концевой области.

Действительно, высокая частота метилирования *PTENP1* обнаружена во всех образцах ткани эндометрия, кроме нормального эндометрия молодых женщин (табл. 2). В то же время 73% (8 из 11, табл. 2) образцов нормального эндометрия женщин СПВ с метилированным *PTENP1* оказались

мозаичными, т.е. содержали некоторое количество клеток с неметилированным или частично метилированным псевдогеном (данные не представлены). Мозаичное метилирование псевдогена выявлено и в ряде образцов тканей эндометрия пациенток с ГЭ и РЭ (см., например, рис. 1, дорожки 3н и 3м), что могло быть обусловлено, в том числе, загрязнением биоптатов опухолей нормальными клетками. Метилирование было тканеспецифичным и не наблюдалось в крови пациенток. Сравнение частот метилирования *PTENP1* в группах РЭ и ГЭ и в контрольной группе женщин СПВ не выявило статистически значимых различий между ними ($0.45 < p < 0.35$). Во всех группах уровень метилирования был высоким (71–77% у пациенток против 58% в контрольной подгруппе 2). При этом средний возраст пациенток с РЭ и ГЭ, включенных в это исследование, соответствовал среднему возрасту женщин контрольной подгруппы 2 (54.3, 52.1 и 52.5 лет соответственно). Не обнаружено значимых различий в метилировании *PTENP1* и в подгруппах основной группы РЭ, в которых пациентки были разделены по клинико-патологическим характеристикам: возрасту, стадии заболевания, глубине инвазии опухолей в миометрий, степени дифференцировки раковых клеток, а также подтипам опухолей (табл. 3). Однако найдены статистически значимые различия в частотах метилирования *PTENP1* в нормальном эндометрии молодых (4%) и женщин СПВ (58%) ($p < 0.001$). Такие результаты оказались неожиданными. Они позволяют предполагать, что метилирование псевдогена *PTENP1* отражает, в первую очередь, возрастные изменения в организме человека и не связано непосредственно с исследуемой патологией эндометрия.

Таблица 2. Метилирование промоторов гена *PTEN* и псевдогена *PTENP1* в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия

Ген	Кровь	Нормальный эндометрий, средний возраст (крайние значения)		Гиперплазия без атипии	Гиперплазия с атипией	Рак эндометрия
		24 (17–34)	52.5 (45–65)			
<i>PTEN</i>	0.00 (0/25)*	0.00 (0/24)	0.00 (0/19)	0.00 (0/30)	0.00 (0/13)	0.00 (0/57)
<i>PTENP1</i>	0.00 (0/25)	4.17 (1/24)	57.89 (11/19)	73.33 (22/30)	76.92 (10/13)	70.83 (17/24)**
<i>P</i>		<0.001***		0.351****	0.450****	0.521****

Примечание. Двусторонний точный критерий Фишера.

*Первая цифра – процент метилированных образцов ДНК, вторая цифра – число метилированных образцов, третья цифра – общее число образцов.

**Из основной группы в 57 человек с РЭ выделена подгруппа, соответствующая по возрасту контрольной группе сравнения.

***Нормальный эндометрий 24 (17–34) против 52.5 (45–65).

****Против нормального эндометрия 52.5 (45–65).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В 2001 г. Salvesen и соавт. впервые попытались проанализировать статус метилирования промотора гена *PTEN* при РЭ. Метилирование было обнаружено у 19% пациенток. Однако эти данные оказались ошибочными, поскольку не учитывали высокую гомологию между геном и его псевдогеном *PTENP1* [39]. Позднее Zysman и соавт. также исследовали метилирование промоторной области *PTEN* при РЭ [40]. В этом случае в метилчувствительной ПЦР использовали уже *PTEN*-специфичные праймеры. Анализировали два сайта: первый – в минимальном промоторе гена *PTEN*, а второй – вблизи АТГ-кодона. Оба сайта оказались неметилированными. Эти данные позволили предположить, что при исследовании промотора гена *PTEN* с использованием праймеров, не дифференцирующих *PTEN* и его псевдоген, выявляется метилирование именно *PTENP1*, но не *PTEN*. Статус метилирования других участков гена *PTEN* с *PTEN*-специфичными праймерами при РЭ и ГЭ больше не анализировали. Тем не менее метилирование иных участков промоторной области этого гена обнаружено и при других онкологических заболеваниях [32, 38, 41]. Поэтому мы предположили, что в тканях РЭ могли быть метилированы уже исследованные и новые последовательности промоторной области гена *PTEN*, которые ранее не изучали

Таблица 3. Ассоциация метилирования псевдогена *PTENP1* с клинико-патологическими характеристиками больных раком эндометрия

Клинико-патологические характеристики	n	M(H)	M, %	p
<i>Средний возраст (крайние значения)</i>				0.784
55 (48–60)	27	19(8)	70.37	
68 (61–76)	30	20(10)	66.66	
<i>Стадия FIGO</i>				1.00
I	46	31(15)	67.39	
II + III	11	8(3)	72.73	
<i>Инвазия в миометрий</i>				0.359
Есть	17	10(7)	58.82	
Нет	40	29(11)	72.50	
<i>Дифференцировка опухоли</i>				0.774
высокая (G1)	31	21(10)	67.74	
умеренная и низкая (G2 + G3)	26	19(7)	73.08	
<i>Подтип по Вокман</i>				1.00
I	19	14(5)	73.68	
II	11	8(3)	72.73	

Примечание. Точный критерий Фишера, двусторонний. М – метилированный, Н – неметилированный.

при этом заболевании. Руководствуясь этим, мы выбрали для исследования новый локус, расположенный в непосредственной близости от минимального промотора, а также две дистально расположенных последовательности, которые уже анализировали ранее (рис. 2, подробнее см. раздел «Результаты»). Один из них, локализованный между праймерами *PN4*, был метилирован в 60% случаев меланомы [38].

Как показано нами, проанализированные последовательности промоторной области гена *PTEN* не метилированы ни в одном из изученных образцов тканей. С учетом этих, а также опубликованных данных мы сделали вывод о том, что метилирование промотора гена *PTEN* не участвует в его инактивации при РЭ и ГЭ, по крайней мере, у наших пациенток. Поэтому мы предположили, что в этом случае подавление экспрессии гена *PTEN* могло происходить по механизму конкурирующих эндогенных РНК или с участием асРНК путем ингибирования транскрипции псевдогена *PTENP1* через метилирование его промоторной области.

Действительно, мы обнаружили высокую частоту метилирования 5'-концевой области *PTENP1* у пациенток с РЭ (70.83%), а также при ГЭ без атипии и с атипией (73.33 и 76.92 % соответственно, табл. 2). Эти результаты соответствуют опубликованным данным. В частности, метилирование 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* выявляли в 66% случаев мелкоклеточного рака легкого [32]. Однако неожиданным оказалось метилирование псевдогена в образцах эндометрия, полученного от здоровых женщин в возрасте 45–65 лет. Метилирование в этой контрольной подгруппе обнаружили в 57.89% случаев. В то же время метилирование *PTENP1* имело место лишь у 4% здоровых молодых женщин в возрасте от 17 до 34 лет (табл. 2). Различия в частотах метилирования ДНК в этих подгруппах были статистически значимыми ($p < 0.001$). Дальнейший анализ не выявил значимых различий в частотах метилирования *PTENP1* у здоровых женщин СПВ и пациенток с РЭ и ГЭ. Также не обнаружено корреляции между метилированием псевдогена и стадиями РЭ, степенью дифференцировки клеток, глубиной инвазии в миометрий или подтипами рака (табл. 3). Необходимо также подчеркнуть отсутствие метилирования в крови пациенток с РЭ, в эндометрии которых псевдоген был метилирован. Все это указывает на тканеспецифический характер данного явления, которое сопровождается изменениями в здоровом эндометрии при старении организма человека.

В настоящее время не известно, как обнаруженное нами метилирование исследуемой области псевдогена *PTENP1* влияет на его экспрессию и экспрессию гена *PTEN*. Теоретически возможны три

варианта последствий метилирования: отсутствие влияния на экспрессию *PTEN*, подавление или стимуляция его работы. Упомянутые во «Введении» три *PTENP1*-днРНК (рис. 2), синтезируемые с исследуемого промотора, оказывают противоположное действие [27]. *PTENP1*-асРНК- α ингибирует транскрипцию *PTEN* через гетерохроматинизацию его промотора путем триметилирования гистона H3 в этом участке хроматина. *PTENP1*-сРНК, конкурируя за миРНК с *PTEN*-мРНК, выполняет функции кэРНК, а *PTENP1*-асРНК- β стабилизирует *PTENP1*-сРНК. Физиологический исход метилирования псевдогена будет зависеть от изменения соотношения между этими тремя *PTENP1*-РНК в клетках эндометрия. Стабилизация или стимуляция работы гена опухолевого супрессора *PTEN* при преимущественном одновременном синтезе *PTENP1*-сРНК и *PTENP1*-асРНК- β может защищать от канцерогенеза. Последствие подавления его активности может быть двояким. Частичная инактивация *PTEN* под действием этого эпигенетического механизма может быть маркером предракового состояния клеток эндометрия. В то же время полная быстрая его инактивация также могла бы выполнять защитные функции в стареющих клетках эндометрия.

Недавно группой P. Pandolfi был обнаружен новый *PTEN*-зависимый механизм старения клеток, получивший название клеточного старения, индуцированного инактивацией *PTEN* (*PTEN*-loss-induced cellular senescence – PICS) [42]. В отличие от классических механизмов старения, например, под действием гиперактивации онкогенов PICS (по крайней мере, у мышей [42] и в первичных клетках эпителия человека [43]) может быстро развиваться в непролиферирующих клетках в отсутствие клеточного ответа на повреждение ДНК. При этом развитие PICS зависит от уровня активности внутриклеточного *PTEN*. Старение клеток и блокирование клеточного цикла по этому механизму в еще немалигнизированных клетках происходят при полной инактивации *PTEN*, тогда как его частичная инактивация может сопровождаться инициацией канцерогенеза и пролиферацией малигнизированных клеток [42]. В этой связи можно предположить, что *PTEN*, частично инактивированный соматическими мутациями в клетках эндометрия, создает опасность малигнизации кле-

ток. Поэтому для полного подавления прохождения клеток по клеточному циклу и предотвращения развития опухолей по этому механизму необходима быстрая полная инактивация *PTEN*. Это, по-видимому, могло происходить путем подавления транскрипции псевдогена *PTENP1* через метилирование его промотора и/или истощения кэРНК, функции которой выполняет *PTENP1*-сРНК. Если такое предположение верно, то метилирование *PTENP1* можно рассматривать как одно из звеньев защиты от стареющих клеток с высоким риском малигнизации. В этом случае метилирование *PTENP1*, обнаруживаемое в клетках ГЭ и РЭ, может быть следствием предшествовавшей или еще происходящей борьбы с их злокачественным перерождением. Для подтверждения или опровержения этой модели требуется проведение дополнительных исследований влияния метилирования *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения нормальных тканей, злокачественных опухолей и гиперплазий эндометрия у женщин разного возраста установлено, что ни в одной из них промоторная область гена опухолевого супрессора *PTEN* не метилирована. В отличие от этого, двунаправленный промотор псевдогена *PTENP1* метилирован с высокой частотой во всех исследованных тканях, кроме эндометрия молодых здоровых женщин, а также крови больных раком эндометрия. Сделан вывод, что метилирование псевдогена *PTENP1* отражает возрастные изменения в организме человека и может не быть связано непосредственно с исследуемой патологией эндометрия. Обосновано предположение, согласно которому в зависимости от влияния метилированного *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN* метилирование псевдогена может защищать организм от развития РЭ или служить маркером предракового состояния клеток. Для выбора между этими альтернативными возможностями необходимо дополнительно исследовать влияние метилирования *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN* в культивируемых клетках человека. ●

Работа проведена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-08-00801).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morice P., Leary A., Creutzberg C., Abu-Rustum N., Darai E. // *Lancet*. 2016. V. 387. № 10023. P. 1094–1108.
2. Evans-Metcalf E.R., Brooks S.E., Reale F.R., Baker S.P. // *Obstet. Gynecol.* 1998. V. 91. P. 349–354.
3. Duska L.R., Garrett A., Rueda B.R., Haas J., Chang Y., Fuller A.F. // *Gynecol. Oncol.* 2001. V. 83. P. 388–393.

4. Garg K., Soslow R.A. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014. V. 138. P. 335–342.
5. Sheikh M.A., Althouse A.D., Freese K.E., Soisson S., Edwards R.P., Welburn S., Sukumvanich P., Comerchi J., Kelley J., LaPorte R.E., et al. // *Future Oncol.* 2014. V. 10. P. 2561–2568.
6. Werner H.M.J., Salvesen H.B. // *Curr. Oncol. Rep.* 2014. V. 16. P. 403.

7. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C., Schultz N., Cherniack A.D., Akbani R., Liu Y., Shen H., et al. // *Nature*. 2013. V. 497. № 7447. P. 67–73.
8. Bokhman J.V. // *Gynecol. Oncol.* 1983. V. 15. P. 10–17.
9. Tsikouras P., Bouchlariotou S., Vrachnis N., Dafopoulos A., Galazios G., Csorba R., von Tempelhoff F.G. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2013. V. 169. P. 1–9.
10. Mazur M.T. // *Annals Diagn. Pathol.* 2005. V. 9. P. 174–181.
11. Sivridis E., Giatromanolaki A. // *Virchows Arch.* 2008. V. 453. P. 223–231.
12. Mills A.M., Longacre T.A. // *Semin. Diagn. Pathol.* 2010. V. 27. P. 199–214.
13. Wise M.R., Jordan V., Lagas A., Showell M., Wong N., Lensen S., Farquhar C.M. // *Am. J. Obst. Gynecol.* 2016. V. 214. № 6. P. 689.e1–689.e17.
14. Kandoth C., McLellan M.D., Vandin F., Ye K., Niu B., Lu C., Xie M., Zhang Q., McMichael J.F., Wyczalkowski M.A., et al. // *Nature*. 2013. V. 502. P. 333–339.
15. Blanco-Aparicio C., Renner OLeal J.F.M., Carnero A. // *Carcinogenesis*. 2007. V. 28. № 7. P. 1379–1386.
16. Matias-Guiu X., Prat J. // *Histopathology*. 2013. V. 62. P. 111–112.
17. Song M.S., Salmena L., Pandolfi P.P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. P. 283–296.
18. Milella M., Falcone I., Conciatori F., Cesta Incani U., Del Curatolo A., Inzerilli N., Nuzzo C.M., Vaccaro V., Vari S., Cognetti F., Ciuffreda L. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 24.
19. McCabe N., Kennedy R.D., Prise K.M. // *Oncoscience*. 2016. V. 3. № 2. P. 54–55.
20. Brito M.B., Goulielmaki E., Papakonstanti E.A. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 166.
21. Stambolic V., MacPherson D., Sas D., Lin Y., Snow B., Jang Y., Benchimol S., Mak T.W. // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. № 2. P. 317–325.
22. Song L.B., Li J., Liao W.T., Feng Y., Yu C.P., Hu L.J., Kong Q.L., Xu L.H., Zhang X., Liu W.L., et al. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 12. P. 3626–3636.
23. Whelan J.T., Forbes S.L., Bertrand F.E. // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. № 1. P. 80–84.
24. He L. // *Sci. Signal*. 2010. V. 3. P. 146, pe39.
25. Polisen L., Salmena L., Riccardi L., Fornari A., Song M.S., Hobbs R.M., Sportoletti P., Varmeh S., Egia A., Fedele G., et al. // *Sci. Signal*. 2010. V. 3. P. 117, ra29.
26. Dahia P.L.M., FitzGerald M.G., Zhang X., Marsh D.J., Zheng Z., Pietsch T., von Deimling A., Haluska F.G., Haber D.A., Eng C. // *Oncogene*. 1998. V. 16. P. 2403–2406.
27. Johnsson P., Ackley A., Vidarsdottir L., Lui W., Corcoran M., Grandner D., Morris K.V. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 4. P. 440–446.
28. Polisen L., Salmena L., Zhang J., Carver B., Haveman W.J., Pandolfi P.P. // *Nature*. 2010. V. 465. P. 1033–1038.
29. Tay Y., Kats L., Salmena L., Weiss D., Tan S.M., Ala U., Karreth F., Polisen L., Provero P., Di Cunto F., et al. // *Cell*. 2011. V. 147. P. 344–357.
30. Polisen L., Pandolfi P.P. // *Methods*. 2015. V. 77–78. P. 41–50.
31. Polisen L., Haimovic A., Christos P.J., Vega Y., Saenz de Miera E.C., Shapiro R., Pavlick A., Berman R.S., Darvishian F., Osman I. // *J. Invest. Dermatol.* 2011. V. 131. № 12. P. 2497–2500.
32. Marsit C.J., Zheng S., Aldape K., Hinds P.W., Nelson H.H., Wiencke J.K., Kelsey K.T. // *Hum. Pathol.* 2005. V. 6. № 7. P. 768–776.
33. Yu G., Yao W., Gumireddy K., Li A., Wang J., Xiao W., Chen K., Xiao H., Li H., Tang K. // *Mol. Cancer Ther.* 2014. V. 13. № 12. P. 3086–3097.
34. Kovalenko T.F., Sorokina A.V., Ozolinya L.A., Patrushev L.I. // *Bioorg. Khim.* 2013. V. 39. № 4. P. 445–453.
35. Lindblom B., Holmlund G. // *Gene Anal. Techn.* 1998. № 5. P. 97–101.
36. Pikor L.A., Enfield K.S., Cameron H., Lam W.L. // *J. Visual. Exp.* 2011. e2763. P. 1–3.
37. Patrushev L.I., Valiaev A.G., Golovchenko P.A., Vinogradov S.V., Chikindas M.L., Kiselev V.I. // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 1993. V. 27. № 5. P. 1100–1112.
38. Lahtz Ch., Stranzenbach R., Fielder E., Hembola P., Dammann R.H. // *J. Invest. Dermatol.* 2010. V. 130. P. 620–622.
39. Salvesen H.B., Mac Donald N., Ryan A., Jacobs I.J., Lynch E.D., Akslén L.A., Das S. // *Int. J. Cancer*. 2001. V. 91. P. 22–26.
40. Zysman M.A., Chapman W.B., Bapat B. // *Am. J. Pathol.* 2002. V. 160. № 3. P. 795–800.
41. Garcia J.M., Silva J., Peña C., Garcia V., Rodriguez R., Cruz M.A., Cantos B., Provencio M., España P., Bonilla F. // *Genes. Chromosomes Cancer*. 2004. V. 41. P. 117–124.
42. Alimonti A., Nardella C., Chen Z., Clohessy J.G., Carracedo A., Trotman L.C., Cheng K., Varmeh S., Kozma S.C., Thomas G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. P. 681–693.
43. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. P. 1424–1435.