

Метилирование отдельных CpG-динуклеотидов в генах сигнального пути Wnt как потенциальный эпигенетический маркер злокачественных новообразований молочной железы

Москалев Е.А.^{1,2*}, Бубнов В.В.^{3**}, Лебедев И.Н.^{2***}

¹ — Институт патологии, Университет Фридриха-Александра в Эрлангене и Нюрнберге, г. Эрланген, Германия, * moskalyov@mail.ru

² — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск, *** igor.lebedev@medgenetics.ru

³ — Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса, Украина, ** bubnov@ukr.net

Актуальность. Аномальные изменения профилей метилирования ДНК в опухолевых клетках обладают высоким потенциалом для применения в качестве онкомаркеров. Злокачественные новообразования молочной железы являются одним из наиболее распространенных типов онкопатологии, в связи с чем идентификация новых молекулярно-генетических диагностических маркеров приобретает особую актуальность. **Цель.** Целью работы явилась характеристика профилей метилирования генов онкогенного пути Wnt *SFRP2*, *PYGO1* и *WIF1* с точки зрения их потенциального применения в качестве эпигенетических маркеров злокачественных новообразований молочной железы. **Материалы и методы.** Для характеристики профилей метилирования ДНК вблизи точек начала транскрипции генов-кандидатов использован метод бисульфитного секвенирования. Анализ аналитической чувствительности и специфичности детекции опухолей проводили с помощью кривых ROC в статистическом пакете SPSS. **Результаты.** В опухолевых образцах обнаружено гиперметилирование исследованных областей генов *SFRP2*, *PYGO1* и *WIF1*, включающих 14, 5 и 7 CpG-динуклеотидов, соответственно. В целом, в опухолях уровень метилирования ДНК был значительно выше, чем в гистологически нормальной ткани. Использование индекса метилирования наиболее информативных единичных CpG-динуклеотидов обеспечило высокие показатели чувствительности и специфичности детекции опухолевых образцов: 88% и 94% (ген *SFRP2*, здесь и далее: чувствительность и специфичность), 100% и 81% (ген *PYGO1*), 81% и 88% (ген *WIF1*). Значимых изменений уровня метилирования CpG-динуклеотидов в зависимости от клинической стадии опухолей не обнаружено, что свидетельствует о раннем возникновении аномалий гиперметилирования при развитии рака молочной железы. **Выводы.** Уровень метилирования отдельных CpG-динуклеотидов генов *SFRP2*, *PYGO1* и *WIF1* позволяет с высокой точностью детектировать образцы злокачественных новообразований молочной железы и представляет интерес в качестве потенциальных диагностических маркеров. Обнаружение аномального гиперметилирования уже на ранних стадиях развития опухоли перспективно в контексте разработки методов ранней онкодиагностики.

Ключевые слова: метилирование ДНК, CpG-динуклеотиды, эпигенетические биомаркеры, злокачественные новообразования молочной железы, бисульфитное пиросеквенирование

Single CpG methylation of Wnt signalling pathway components as a potential epigenetic marker of breast cancer

Moskalev E.A.^{1,2*}, Bubnov V.V.^{3**}, Lebedev I.N.^{2***}

¹ — Institute of Pathology, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany, * moskalyov@mail.ru

² — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRC, Tomsk, Russia, *** igor.lebedev@medgenetics.ru

³ — Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine, ** bubnov@ukr.net

Background. Aberrant alterations of DNA methylation patterns in tumour cells are recognised as cancer-specific markers with high potential for clinical applications. Breast cancers represent one of the most common malignancies, what necessitates the development of molecular biomarkers to improve their diagnostics. **Aim.** Current work aimed at DNA methylation profiling of Wnt signalling pathway components *SFRP2*, *PYGO1* and *WIF1* and testing the biomarker potential for the detection of breast cancer specimens. **Materials and Methods.** Bisulfite pyrosequencing was employed for DNA methylation profiling in the vicinity of transcription start sites of the candidate genes. Analytical sensitivity and specificity of cancer detection were calculated using ROC curve analysis and SPSS software package. **Results.** In the breast cancer specimens, DNA hypermethylation was detected within the explored regions of *SFRP2*, *PYGO1* and *WIF1* that included 14, 5 and 7 CpG-sites, respectively. Generally, a significantly higher methylation degree was found in the cancer specimens than in the histologically normal control tissue. High sensitivity and specificity of cancer detection was achieved when considering the methylation percentages of most informative single CpG-sites as potential biomarkers, namely 88% and 94% (*SFRP2*, hereafter: sensitivity and specificity), 100% and 81% (*PYGO1*), 81% and 88% (*WIF1*). No significant difference in the DNA methylation degree was detected at different stages of breast cancer suggesting an early onset of aberrant DNA hypermethylation. **Conclusions.** Breast cancer specimens can be accurately detected by analysing the methylation degrees of single CpG-sites of the explored genes, which are of interest as potential diagnostic markers. Identification of aberrant DNA hypermethylation pattern already at the early stages of tumour progression holds promise in the context of developing epigenetics-based early diagnostics.

Key words: DNA methylation, CpG-sites, epigenetic biomarkers, breast cancer, bisulfite pyrosequencing

Введение

Характер метилирования онко-ассоциированных генов является перспективным источником молекулярно-генетических маркеров для диагностики онкологических заболеваний [1]. Так, в отличие от мутаций [2, 3] изменения профилей метилирования ДНК, связанные с потерей экспрессии генов, как правило, происходят в определённом участке гена, например, в промоторной области или первом экзоне [1]. Гиперметилование регуляторных областей генов специфично для опухолей и почти никогда не происходит в нормальных тканях. Это более частое событие по сравнению со структурными изменениями генома, причём возникающее уже на ранних этапах опухолеобразования [4, 5]. Наконец, высокочувствительные методы для анализа характера метилирования ДНК обеспечивают идентификацию следовых количеств аномально гиперметилованных молекул в малых объёмах клинического материала [6, 7].

В предыдущей работе с использованием олигонуклеотидных ДНК-чипов мы выявили молекулярный идентификатор на основе уровня метилирования CpG-динуклеотидов генов *GHSR* и *SFRP2*, который обеспечивает высокоточную дискриминацию злокачественных новообразований молочной железы с одной стороны и прилежащей к опухоли гистологически нормальной ткани, доброкачественных изменений и ткани здоровых индивидов с другой стороны [8]. Принимая во внимание функциональную значимость онкогенного сигнального пути Wnt [9, 10], компонентом которого является белок *SFRP2*, в данной работе мы дополнительно изучили характер метилирования и других компонентов сигнального каскада Wnt: генов *WIFI* и *PYGO1*. С использованием ограниченной выборки парных образцов опухолей и гистологически нормальной ткани больных впервые показана потенциальная применимость анализа метилирования гена *PYGO1* для детекции злокачественных

новообразований молочной железы, а также подтверждены высокие показатели аналитической чувствительности и специфичности метилирования гена *SFRP2*. Поскольку для потенциального диагностического применения желательна рассмотрение минимального числа CpG-динуклеотидов, для каждого изученного гена был выбран один наиболее информативный CpG-динуклеотид, для которого оценена чувствительность и специфичность детекции опухолевых образцов. Полученные результаты представляют интерес в контексте эпигенетической онкодиагностики.

Цель и задачи

Цель работы состояла в характеристике профилей метилирования генов онкогенного пути Wnt *SFRP2*, *PYGO1* и *WIFI* с точки зрения потенциальных эпигенетических маркеров злокачественных новообразований молочной железы. Задачами работы был анализ профилей метилирования участков данных генов, расположенных вблизи точек начала транскрипции, выбор CpG-динуклеотидов, индекс метилирования которых максимально дискриминирует опухоль и контрольную ткань, и их использование для анализа аналитической чувствительности и специфичности детекции опухолей. Дополнительной задачей являлась оценка уровня метилирования избранных остатков цитидина на разных стадиях рака молочной железы.

Материалы и методы

В работе использована ограниченная выборка из 16 парных образцов опухолей и прилежащей гистологически нормальной ткани от больных со злокачественными новообразованиями молочной железы, включающими инфильтрирующие протоковые и дольковые карциномы (табл. 1). Образцы получены из Одесского на-

Таблица 1

Исследованная выборка больных злокачественными новообразованиями молочной железы

Исследуемые образцы	
Число	16
Возраст пациентов, годы	
Средний	61,2
Диапазон	45–73
Гистологические подтипы	
Инфильтрирующая протоковая карцинома	11
Инфильтрирующая протоковая и дольковая карцинома	5
Стадии	
I	3
II	4
III	7
IV	2

ционального медицинского университета с полным соблюдением биоэтических норм.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора Dneasy Blood & Tissue kit («Qiagen», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. ДНК в количестве 2 мкг обрабатывали бисульфитом натрия с использованием набора EpiTect Bisulfite kit («Qiagen»). Расположенные вблизи точек начала транскрипции генов *SFRP2*, *WIF1* и *PYGO1* участки амплифицировали методом ПЦР в 50 мкл реакционной смеси, содержащей фермент Taq ДНК-полимеразу с «горячим стартом» (HotStarTaq, «Qiagen»), буфер в 10х разведении, 1,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 1,2 Ед. фермента. Программа амплификации включала этап активации ДНК-полимеразы при 95°C в течение 15 мин, 1 мин денатурации при 95°C, 2 мин отжига праймеров при 62°C и элонгацию в течение 3 мин. При данном температурном режиме проводили 20 циклов амплификации, при этом в каждом последующем цикле температура отжига снижалась на 0,5°C. Дальнейшие 20 циклов (гены *WIF1* и *PYGO1*) или 30 циклов (ген *SFRP2*) амплификации проводили, денатурируя ДНК при 95°C в течение 1 мин, с последующим отжигом праймеров при фиксированной температуре 52°C в течение 2 мин и элонгации в течение 2 мин. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в табл. 2.

Пиросеквенирование ампликонов проводили с использованием набора Pyro Gold Reagent («Qiagen») на пиросеквенаторе PSQ HS 96 Pyrosequencing System («Biotage», Швеция) в соответствии с протоколом изготовителя. Индекс метилирования CpG-динуклеотидов оценивали в программе PyroQ-CpG v.1.0.9 («Biotage»). Для контроля и корректировки экспериментального искажения индекса метилирования ДНК, вызванного амплификацией анализируемых генных участков, использовали контрольные пробы ДНК известной степени метилирования — 0, 25, 50, 75 и 100% — полученные из полностью метилированной и неметилированной ДНК

(EpiTect PCR control DNA, «Qiagen»), обработанной бисульфитом [11].

Сравнительный анализ уровня метилирования в образцах опухолей и контрольной ткани проводили с использованием непараметрического теста Манна—Уитни в программной среде R. Для анализа аналитической чувствительности и специфичности детекции опухолей использовали статистический пакет SPSS v. 19.0.0.1.

Результаты

Для идентификации CpG-динуклеотидов, уровень метилирования которых дискриминирует злокачественные новообразования молочной железы и окружающую опухоль гистологически нормальную ткань, был проведён анализ профилей метилирования вблизи точек начала транскрипции трёх генов онкогенного сигнального пути Wnt. Применение бисульфитного пиросеквенирования обеспечило анализ с высоким разрешением, позволивший получить количественную оценку уровня метилирования 14 CpG-динуклеотидов гена *SFRP2*, 7 остатков цитидина в гене *WIF1* и 5 CpG-динуклеотидов гена *PYGO1* (рис. 1). В целом, уровень метилирования всех исследованных участков в опухоли значительно превосходил данный показатель в образцах окружающих опухоль тканей.

Для дальнейшей количественной оценки биомаркерного потенциала в каждом исследованном гене был выбран один CpG-динуклеотид, уровень метилирования которого максимально различался в образцах опухоли и контрольной ткани (рис. 2А). С использованием выбранных остатков цитидина был проведён анализ с помощью кривых ROC, позволяющих оценить точность бинарной классификации, т.е. детекции опухолей среди опухолевых и контрольных проб. Информативным показателем, отражающим качество изучаемого маркера, является величина площади под кривой AUC. Так, величины AUC для генов *SFRP2*, *PYGO1* и *WIF1* составили 0,939, 0,934 и

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3') F: прямой; R: обратный; S: секвенирующий праймеры; bio: модификация биотином	Длина ампликона, п.н.	Число исследованных CpG-динуклеотидов
SFRP2-F	bio-TTTTTATTTTTAGATTTGTATAAAAA	316	14
SFRP2-R	AACCAAAACCCTACAACATC		
SFRP2-S	AAAACTAACAACC		
WIF1-F	bio-GAGTGATGTTTTAGGGGTTT	414	7
WIF1-R	CCTAAATACCAAAAAACCTAC		
WIF1-S	AAACTACATTCACAATAC		
PYGO1-F	TGAGATTTAGAGAGGTTATTTAAGT	317	5
PYGO1-R	bio-ACATATAAAAATCCAAATCCCC		
PYGO1-S	GGTATTTTATAGATAGGTGT		

0,891 соответственно (рис. 2Б). Таким образом, наибольшую точность дискриминации образцов опухоли и контрольной ткани демонстрировал CpG-динуклеотид гена *SFRP2* CpG₊₄₅, обеспечивающий при пороговом уровне метилирования 11,6% значение аналитической чувствительности 88% и специфичности детекции опухоли 94%. Динуклеотид CpG₊₇₆ гена *PYGO1* при пороговом уровне метилирования 5,8% позволял детектировать опухоль с величинами аналитической чувствительности и специфичности 100% и 81% соответственно. Наконец, динуклеотид CpG₋₁₁₀ гена *WIF1* при пороговой величине метилирования 23,5% позволял дискриминировать образцы опухоли и нормальной ткани с 81% чувствительности и 88% специфичности. Комбинация данных CpG-динуклеотидов не приводила к повышению точности детекции опухолевых образцов.

Принимая во внимание известные из литературы факты о наличии эпигенетических aberrаций уже на ранних этапах опухолеобразования, был проанализирован характер метилирования исследованных генов в зависимости от стадий опухолей молочной железы. Значимых изменений уровня метилирования CpG-динуклеотидов ни в одном из исследованных генов не обнаружено (рис. 2В), что является дополнительным подтверждением раннего возникновения аномалий гиперметилирования при развитии рака молочной железы.

Обсуждение

В работе исследованы профили метилирования трёх генов, кодирующих компоненты онкогенного сигнального пути Wnt. Данный каскад служит для передачи сиг-

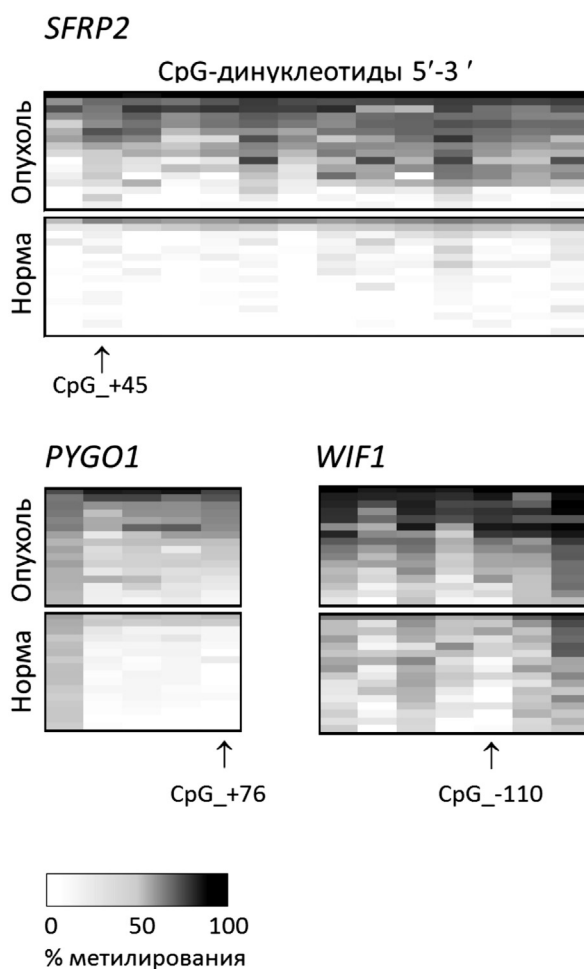


Рис. 1. Профиль метилирования участков ДНК, расположенных вблизи точек начала транскрипции генов *SFRP2*, *WIF1* и *PYGO1*, в злокачественных новообразованиях молочной железы (верхние части теплокарт, «опухоль») и в окружающей опухоль гистологически нормальной ткани (нижние части диаграмм, «норма»).

Столбцы теплокарт соответствуют исследованным CpG-динуклеотидам, строки — образцам опухолей пациентов. Степень метилирования определялась методом бисульфитного пиросеквенирования и отображена на диаграммах в виде оттенка серого (см. шкалу под рисунком). Стрелки указывают на CpG-динуклеотиды, степень метилирования которых максимально отличает образцы опухоли и нормальной ткани и которая использована для построения кривых ROC. Номера CpG-динуклеотидов соответствуют положению остатка цитидина по отношению к точке начала транскрипции.

нала с клеточной поверхности в ядро, где происходит активация транскрипционных программ, обеспечивающих клеточную пролиферацию и устойчивость к апоптозу. Путь Wnt играет критически важную роль в нормальном эмбриональном развитии, и его конститутивная активация ассоциирована со множеством дефектов развития, а также многими новообразованиями, включая злокачественные новообразования молочной железы [9, 12]. Функционирование пути Wnt контролируется несколькими ингибиторами, и их эпигенетическая инактивация может вносить вклад в аномальную активацию данного каскада [13].

В настоящем исследовании мы подтвердили ранее описанные нами высокие показатели чувствительности и специфичности детекции опухолевых образцов на основе уровня метилирования гена *SFRP2* на независимой выборке [8]. Однако в отличие от предыдущих работ, рассматривающих профили метилирования в более протяжённых участках, из исследованных

14 остатков цитидина был выбран лишь один CpG₊+45, демонстрирующий максимальные отличия уровня метилирования в опухолевых и контрольных образцах. Выбор единичных CpG-динуклеотидов для анализа представляется наиболее целесообразным с точки зрения потенциального применения в диагностической практике.

Высокие показатели чувствительности и специфичности детекции обеспечило измерение уровня метилирования одиночного остатка цитидина в первом экзоне гена *PYGO1* CpG₊+76, кодирующего ядерный компонент цепи передачи сигнала. Аномальное метилирование данного гена ранее было показано при хроническом В-клеточном лимфолейкозе ([14] и собственные неопубликованные данные). При раке молочной железы профиль метилирования данного гена исследован впервые. Достаточно высокая точность определения опухолевых образцов продемонстрирована и для CpG-динуклеотида в промоторной области гена *WIF1*.

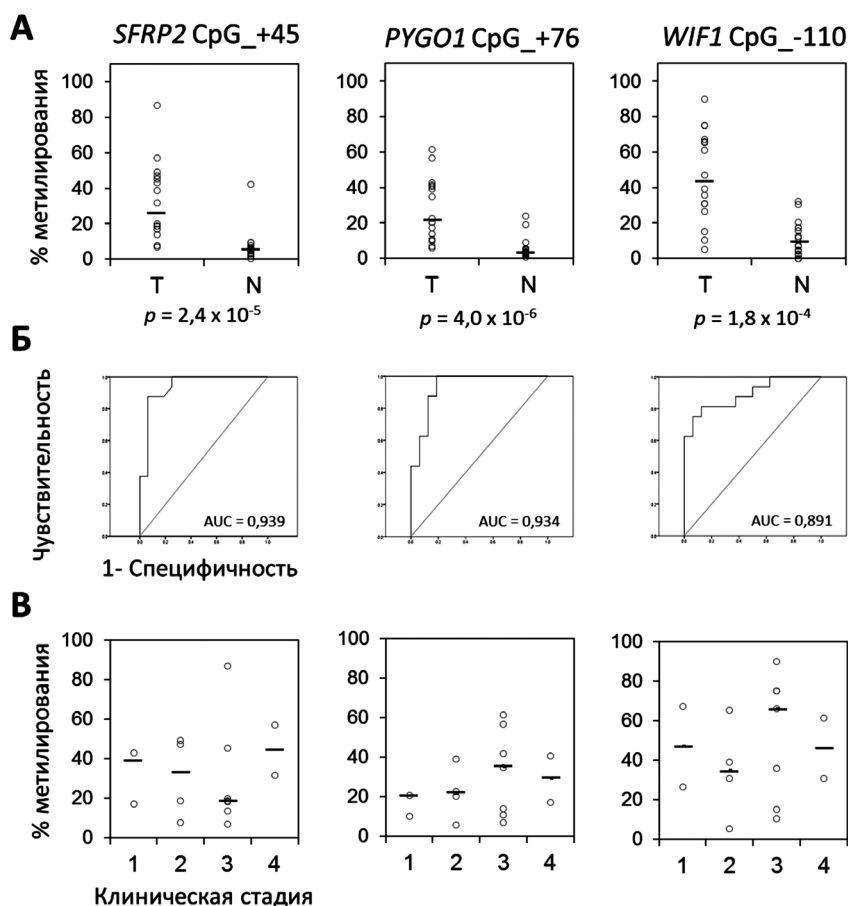


Рис. 2. Уровень метилирования и кривые ROC для избранных CpG-динуклеотидов, демонстрирующих максимальные отличия в степени метилирования в опухоли и прилегающей гистологически нормальной ткани.

(А) Процент метилирования CpG-динуклеотида (вертикальная ось) в опухолях (Т) и норме (N). Каждый кружок обозначает уровень метилирования в отдельном образце ткани. Горизонтальные линии указывают медиану степени метилирования исследованных образцов. Достоверность отличий процента метилирования между группами проверена с помощью теста Манна–Уитни. (Б) Кривые ROC, построенные с использованием данных п. (А). Указаны величины площади под кривыми (AUC). (В) Уровень метилирования CpG-динуклеотидов из п. (А) в опухолях разных клинических стадий. Горизонтальные линии описывают медианные значения уровня метилирования на каждой стадии.

Выводы

Таким образом, результаты, полученные на ограниченной выборке опухолевых образцов, показывают перспективность рассмотрения генов сигнального пути в качестве потенциальных эпигенетических маркеров злокачественных новообразований молочной железы и предполагают дальнейшее исследование маркерного потенциала обнаруженных CpG-динуклеотидов на больших выборках клинически охарактеризованных образцов. Кроме того, в контексте неинвазивной диагностики важным представляется изучение возможности детектировать метилированные формы данных генов в плазме крови больных.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование поддержано научно-исследовательской стипендией Германской службы академических обменов (DAAD) для Е.А.М.

Авторы благодарят Йорг Хоайзел за техническую поддержку и ценные обсуждения.

Список литературы

1. Warton K, Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. *Front Mol Biosci.* 2015;2(13):eCollection.
2. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
3. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE et al. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013; 339(6127):1546-58.
4. Кекеева ТВ, Жевлова АИ, Подистов ЮИ. Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста и микросателлитная нестабильность в предраковых состояниях шейки матки. *Молекулярная биология.* 2006;40:224-230.
5. van Hoesel AQ, Sato Y, Elashoff DA et al. Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *Br J Cancer.* 2013;108(10):2033-2038.
6. Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer.* 2006;94(10):1492-1495.
7. Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdyntseva NV et al. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2013;81(3):397-403.
8. Botla SK, Gholami AM, Malekpour M et al. Diagnostic values of GHSR DNA methylation pattern in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135(3):705-713.
9. Lin SY, Xia W, Wang JC et al. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4262-4266.
10. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):211.
11. Moskalev EA, Zavgorodnij MG, Majorova SP et al. Correction of PCR-bias in quantitative DNA methylation studies by means of cubic polynomial regression. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(11):e77.
12. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):11-26.
13. Klarmann GJ, Decker A, Farrar WL. Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics.* 2008;3(2):59-63.
14. Rush LJ, Raval A, Funchain P et al. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res.* 2004;64(7):2424-2433.