

Нарушения моноаллельного метилирования ДНК при раке молочной железы

Танас А.С.¹, Калинин А.И.¹, Немцова М.В.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Кекеева Т.В.¹,
Виноградов И.Ю.³, Виноградов М.И.⁴, Виноградов И.И.^{3,4}, Залетаев Д.В.¹, Стрельников В.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 — ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)»
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

3 — ГБУ Рязанской области «Областной клинический онкологический диспансер»
390046, г., Рязань, ул. Спортивная, д. 13

4 — ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, д. 9

Цель. Изучение изменений в образцах злокачественных опухолей молочной железы статуса метилирования остатков цитозина в составе CpG-островков, моноаллельно метилированных в норме.

Методы. Для определения CpG-динуклеотидов, моноаллельно метилированных в опухолевых и нормальных тканях молочной железы, использовали полученные авторами ранее результаты широкогеномного бисульфитного секвенирования Xmal-RRBS. Изменения моноаллельного метилирования в опухолях визуализировали с помощью гистограмм для различных метилотипов молочной железы.

Результаты. В геномах умеренно метилированных опухолей нормально моноаллельно метилированные CpG-динуклеотиды имеют тенденцию к почти равновероятному изменению как в неметилированное, так и в полностью метилированное состояние. В геномах гиперметилированных опухолей нормально моноаллельно метилированные CpG-динуклеотиды чаще меняют своё состояние на полностью метилированное.

Заключение. Наблюдаемый характер изменений позволяет предположить, что динамика диктуется в умеренно метилированных опухолях процессами, не определяющими её вектор, а в гиперметилированных - дополнительно - направленным процессом, повышающим уровень метилирования CpG-динуклеотидов. По аналогии с ранее опубликованными результатами исследования динамики изменений метилирования импринтированных локусов в опухолях человека, мы предполагаем, что процесс случайного определения вектора изменения характера метилирования опосредован нарушениями копийности участков моноаллельного метилирования ДНК. Причиной равновероятных разнонаправленных изменений моноаллельного метилирования может быть геномный дисбаланс, который может случайным образом приводить к делециям (или приобретенной однородительской дисомии) либо метилированного, либо неметилированного аллеля.

Ключевые слова: рак молочной железы, широкогеномный анализ метилирования ДНК, моноаллельное метилирование ДНК.

Для цитирования: Танас А.С., Калинин А.И., Немцова М.В., Кузнецова Е.Б., Кекеева Т.В., Виноградов И.Ю., Виноградов М.И., Виноградов И.И., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Нарушения моноаллельного метилирования ДНК при раке молочной железы. *Медицинская генетика* 2021; 20(11): 12-17.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.11.12-17

Автор для корреспонденции: Стрельников Владимир Викторович, e-mail: vstrel@list.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-15-00430, <https://rscf.ru/project/18-15-00430>, и в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 10.11.2021.

Alterations of monoallelic DNA methylation in breast cancer

Tanas A.S.¹, Kalinkin A.I.¹, Nemtsova M.V.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Kekeeva T.V.¹, Vinogradov I.Y.³, Vinogradov M.I.⁴, Vinogradov I.I.^{3,4}, Zaletaev D.V.¹, Strelnikov V.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics

1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 — I. M. Sechenov First Moscow State Medical University

8 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

3 — Ryazan Regional Clinical Oncology Dispensary

13 Sportivnaya st., Ryazan, 390011, Russian Federation

4 — Ryazan State Medical University

9 Vysokovoltynaya st., Ryazan, 390026, Russian Federation

Aim: to evaluate changes in the methylation status of cytosine residues in CpG islands, monoallelically methylated in the norm, in samples of malignant breast tumors.

Methods. To determine CpG dinucleotides monoallelically methylated in tumor and normal breast tissues, we used the results of Xmal-RRBS genome-wide bisulfite sequencing obtained earlier. Changes in monoallelic methylation in tumors were visualized using histograms for different breast methylotypes.

Results. In the genomes of moderately methylated tumors, normally methylated CpG dinucleotides have a tendency to an almost equiprobable methylation change to both the unmethylated and fully methylated states. In the genomes of hypermethylated tumors, normally monoallelically methylated CpG dinucleotides more often change their state to fully methylated.

Conclusions. The observed nature of the changes suggests that the dynamics is dictated in moderately methylated tumors by processes that do not determine their vector, and in hypermethylated tumors, additionally, by a directed process that increases the methylation level of CpG dinucleotides. By analogy with the previously published results of a study of the dynamics of changes in methylation of imprinted loci in human tumors, we assume that the process of random determination of the vector of methylation changes is mediated by copy number aberrations at the regions of monoallelic DNA methylation. The reason for the equally probable bidirectional changes in monoallelic methylation may be a genomic imbalance that can randomly lead to deletions (or acquired uniparental disomy) of either the methylated or unmethylated allele.

Keywords. Breast cancer, genome wide analysis of DNA methylation, monoallelic DNA methylation

For citation: Tanas A.S., Kalinkin A.I., Nemtsova M.V., Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Vinogradov I.Y., Vinogradov M.I., Vinogradov I.I., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Alterations of monoallelic DNA methylation in breast cancer. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(11): 12-17. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.11.12-17

Corresponding author: Vladimir V. Strelnikov, e-mail: vstrel@list.ru

Funding. The research was supported by Russian Science Foundation (project № 18-15-00430, <https://rscf.ru/project/18-15-00430>) and by the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 10.11.2021.

Введение

Моноаллельная экспрессия генов инициируется на ранних стадиях развития организма. Выбор активного и неактивного аллелей может происходить случайным образом (как, например, в процессе инактивации X-хромосом) или может быть предопределен родительским импринтингом [1, 2]. Нарушения моноаллельной экспрессии ассоциированы с некоторыми генетическими заболеваниями человека с менделевским типом наследования. Важным регулятором моноаллельной экспрессии генов у человека является метилирование ДНК [3,4]. Паттерн моноаллельной экспрессии генов является одной из ключевых тканеспецифических молекулярных характеристик конкретного типа клеток, а его нарушение,

сопровождающееся нарушением метилирования ДНК, может быть ассоциировано со злокачественными новообразованиями [5]. Яркий пример моноаллельного метилирования ДНК у человека в норме как способа регуляции моноаллельной экспрессии представляют импринтированные локусы, в которых аллели инактивируются метилированием ДНК в зависимости от родительского происхождения. Явление геномного импринтинга доказано и хорошо изучено, однако количество выявленных импринтированных участков в геноме человека исчисляется единицами. В то же время, растёт количество свидетельств в пользу того, что моноаллельное метилирование не ограничивается импринтированными участками генома человека. Пока-

зано, в частности, что моноаллельное метилирование задействовано в регуляции продукции специфических антител и селекций обонятельных рецепторов [6,7]. Несмотря на то, что важность моноаллельного метилирования в процессах тканевой дифференцировки уже постулирована, конкретные вовлеченные геномные локусы, а также общегеномный масштаб моноаллельного метилирования изучены слабо.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование предоставляет возможность широкогеномного профилирования метилирования ДНК. Бисульфитное секвенирование, которое является золотым стандартом анализа метилирования ДНК с однонуклеотидным разрешением, позволяет однозначно идентифицировать моноаллельно метилированные CpG-динуклеотиды, однако в полногеномном формате такой подход до сих пор остаётся крайне дорогостоящим и, следовательно, находится вне досягаемости большинства исследовательских коллективов. Для решения этой проблемы были предприняты попытки разработать более доступные альтернативные подходы к широкогеномному анализу метилирования ДНК, основанные на специфическом обогащении метилированных частей генома, например, метил-CpG-ДНК-иммунопреципитацией с последующим секвенированием (MeDIP-seq). Однако такие методы не обеспечивают однонуклеотидного разрешения и не несут информации о неметилированных аллелях, поэтому не могут непосредственно использоваться для обнаружения моноаллельного метилирования [8]. Существующие непрямые подходы основаны на комбинации нескольких технологий секвенирования. Так, Harris с соавт. (2010) предложили интегративный подход, основанный на комбинировании данных MeDIP-seq, секвенирования продуктов гидролиза геномной ДНК метилчувствительными рестриктазами (MRE-seq), секвенирования транскриптов (RNAseq) и иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием ДНК (ChIP-seq) [9].

В 2014 году опубликован аналитический алгоритм, использующий результаты высокопроизводительного параллельного секвенирования выборок геномных локусов, предварительно обогащённых метилированными фрагментами ДНК, для поиска участков моноаллельного метилирования на основе классической популяционной генетической модели — равновесия Харди-Вайнберга [3]. На первом этапе работы алгоритма проводится выбор локусов для последующего анализа с точки зрения уникальности их картирования на референсный геном человека. Такие локусы входят в последующий анализ только в случае наличия в их составе информативных (высокогетерозиготных) однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Для каж-

дого из отобранных SNP индивидуально проверяется соответствие равновесию Харди-Вайнберга для оценки того, не является ли наблюдаемая частота образцов с их биаллельным (гетерозиготным) состоянием ниже ожидаемой [10]. Методом пермутаций симулируются границы доверительных интервалов, и участки генома, в которых значения P не превышают заданного уровня с поправкой на множественное тестирование (FDR) считаются кандидатами на наличие моноаллельного метилирования [3].

Мы полагаем, что наиболее адекватный набор данных для прямого извлечения информации о моноаллельно метилированных участках генома представляют собой результаты высокопроизводительного параллельного бисульфитного секвенирования ограниченных выборок геномных локусов (Reduced representation bisulfite sequencing — RRBS) без предварительного обогащения образцов метилированными последовательностями ДНК. RRBS не обеспечивает полного покрытия последовательностей генома человека, однако неполнота покрытия в результатах RRBS компенсируется обогащением анализируемых выборок локусов CpG-островками, играющими критическую роль в регуляции экспрессии генов [11]. В настоящем исследовании для изучения моноаллельного метилирования ДНК нормальных и опухолевых геномов мы использовали собственные результаты RRBS, опубликованные ранее [11].

Методы

В качестве материала для исследования использовали собственные результаты Xmal-RRBS, полученные ранее для 6 образцов нормальной молочной железы (МЖ) и 110 образцов рака молочной железы (PMЖ). Характеристика клинического материала приведена нами ранее [11]. Результаты Xmal-RRBS депонированы в базе NCBI GEO под идентификатором GSE122799.

Препроцессинг данных Xmal-RRBS проводили с помощью собственного находящегося в разработке пакета rrbsData [<https://github.com/tanas80/rrbsData>]. Загрузку в объект для последующих манипуляций производили с помощью функции 'loadRrbsData', фильтрацию по глубине и ширине прочтений выполняли с помощью 'filterRrbsData', а получение матрицы (CpG-динуклеотиды x образцы) для дальнейших вычислений осуществляли с помощью 'rrbsMatrix'. Препроцессинг, обработку и вычисления проводили с помощью языка программирования R 3.6.3.

Изучение нарушений моноаллельного метилирования CpG-динуклеотидов в гиперметилированных и умеренно метилированных опухолях МЖ. Учитывая мор-

фологическую гетерогенность исследуемого материала, критерием включения CpG-динуклеотида в список моноаллельно метилированных приняли значение уровня метилирования (b-value) соответствующего цитозина во всех образцах от 0,25 до 0,75. Визуализацию уровней метилирования CpG-динуклеотидов осуществляли гистограммами для различных метилотипов РМЖ, построенных с помощью функции 'geom_histogram' из пакета ggplot2 [https://doi.org/10.1002/wics.147].

Результаты и обсуждение

На основе результатов широкогеномного бисульфитного секвенирования проведена идентификация участков моноаллельного метилирования в нормальных

тканях МЖ, построены хромосомные карты моноаллельного метилирования CpG-островков. Отмечена кластеризация моноаллельно метилированных CpG-островков как в прителомерных сегментах ряда хромосом (1p, 2q, 4p, 5p, 5q, 7p, 7q, 8q, 9q, 10q, 11p, 12q, 13q, 14q, 15p, 15q, 16p, 16q, 17p, 17q, 18q, 19p, 20q, 21q, 22q), так и в некоторых интерстициальных сегментах, в том числе практически на всём протяжении хромосомы 19. Построены карты распределения участков моноаллельного метилирования в геномах РМЖ, отдельно для каждого из двух основных эпигенетических подтипов — гиперметилированного и умеренно метилированного по CpG-островкам. Паттерн моноаллельного метилирования ДНК умеренно метилированного подтипа РМЖ в целом совпадает с таковым нормального генома МЖ: сохраняется кластеризация моноаллельно метилиро-

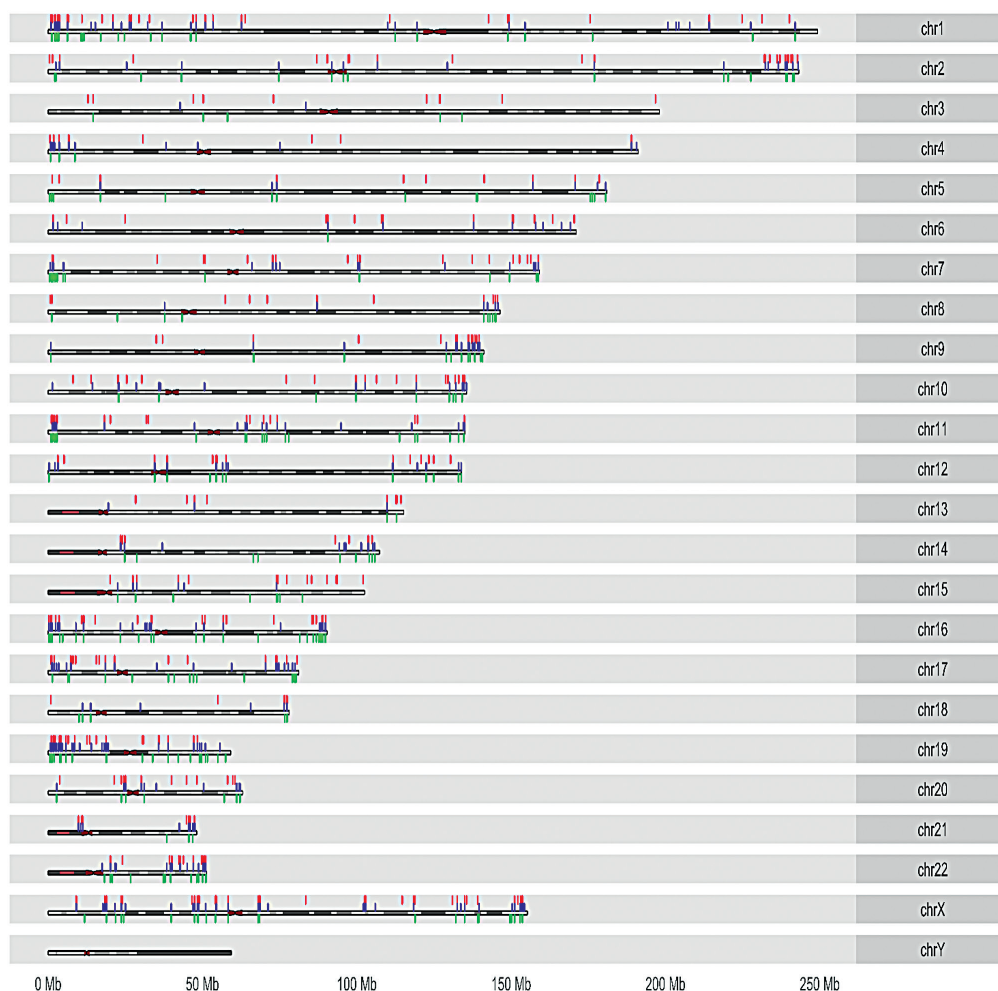


Рис. 1. Карта распределения моноаллельно метилированных CpG-островков в гипер- и умеренно метилированных подтипах РМЖ и в нормальных образцах МЖ по результатам широкогеномного анализа метилирования методом Xmal-RRBS. Зеленым цветом отмечены CpG-динуклеотиды, моноаллельно метилированные в норме, синим – в умеренно метилированных опухолях, красным – в гиперметилированных опухолях.

ванных CpG-динуклеотидов в тех же хромосомных сегментах. В образцах РМЖ гиперметилованного подтипа паттерн моноаллельного метилирования заметно меняется: наблюдается большое количество отдельных моноаллельно метилированных CpG-динуклеотидов, рассеянных, в том числе, и в тех сегментах хромосом, в которых в норме моноаллельного метилирования не наблюдалось (рис. 1).

Мы проанализировали динамику изменений состояния нормально моноаллельно метилированных CpG-динуклеотидов в образцах РМЖ обоих эпигенетических подтипов (рис. 2). В геномах умеренно метилированных опухолей нормально метилированные CpG-динуклеотиды имеют тенденцию к почти равновероятному изменению метилирования как в не-

метилованное, так и в полностью метилированное состояние. В геномах гиперметилованных опухолей нормально моноаллельно метилированные CpG-динуклеотиды чаще меняют своё состояние на полностью метилированное. Наблюдаемый характер изменений позволяет предположить, что динамика диктуется в умеренно метилированных опухолях процессами, не определяющими их вектор, а в гиперметилованных — дополнительно направленным процессом (процессами), повышающим уровень метилирования CpG-динуклеотидов.

Рассмотрение CpG-динуклеотидов, в норме имеющих статус биаллельно метилированных либо неметилованных и приобретающих моноаллельное метилирование в гиперметилованных опухолях, в срав-

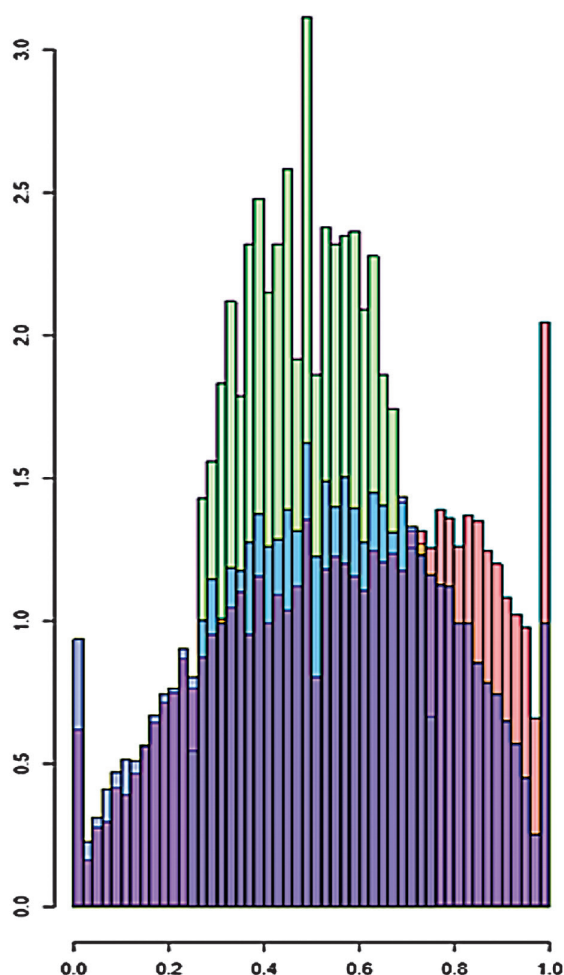


Рис. 2. Изменения нормально моноаллельного метилирования (зеленым) в образцах РМЖ умеренно метилированного (синим) и гиперметилованного подтипов (красным). Ось абсцисс – уровень метилирования (b-value). Ось ординат – плотность вероятности уровня метилирования.

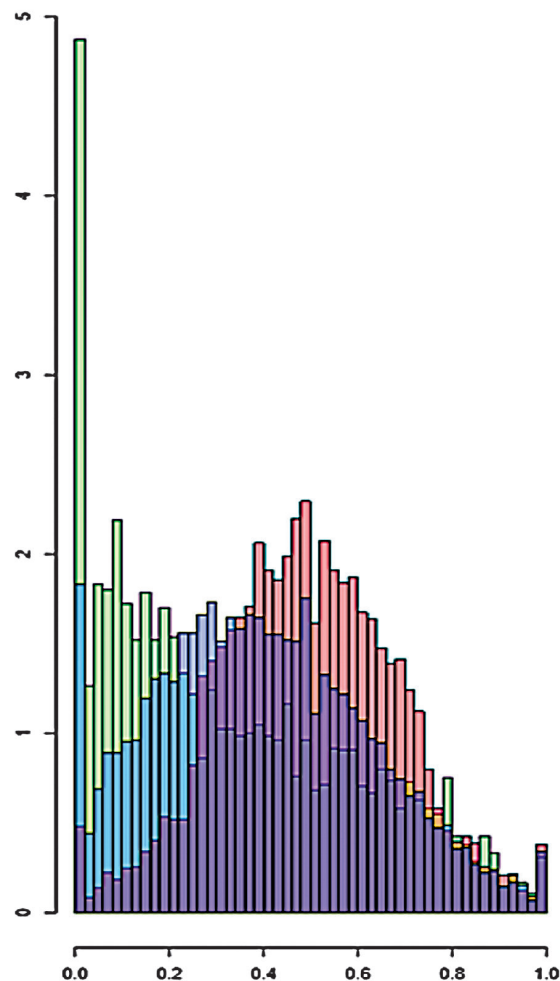


Рис. 3. CpG-динуклеотиды, приобретающие моноаллельное метилирование в гиперметилованных опухолях МЖ (красным) и их состояния в нормальной МЖ (зеленым) и в умеренно метилированных опухолях (синим). Ось абсцисс – уровень метилирования (b-value). Ось ординат – плотность вероятности уровня метилирования.

нении с поведением этих же CpG-динуклеотидов в умеренно метилированных опухолях (рис. 3) показывает, что (1) основным субстратом для *de novo* моноаллельно метилированных CpG-динуклеотидов в гиперметилированном подтипе служат, в подавляющем большинстве, полностью неметилированные в норме, то есть приобретение статуса *de novo* моноаллельного метилирования в этом подтипе осуществляется за счет активного процесса метилирования ранее неметилированных цитозинов; (2) в опухолях умеренно метилированного подтипа значительная доля тех же CpG-динуклеотидов сохраняет полностью неметилированное состояние, что может отражать менее интенсивный процесс активного метилирования *de novo* в этом типе опухолей.

В научной литературе вопрос о причинах и механизмах опухоль-ассоциированного аномального метилирования ДНК обычно решается относительно конкретных геномных локусов — промоторов генов опухолевых супрессоров или мотивов нуклеотидных последовательностей [12,13]. При этом речь идет о приобретении в опухолях метилированного состояния теми CpG-островками, которые в нормальных тканях полностью неметилированы. Категория моноаллельного метилирования ДНК и вопрос о её месте в динамике метилирования CpG-островков в опухолях рассматривались до сих пор лишь в одной работе, посвященной исследованию изменений метилирования ДНК в импринтированных локусах генома человека в злокачественных опухолях [14]. Авторы показали, что профили метилирования импринтированных районов часто преимущественно отражают нарушения их копийности (CNA). В нашем исследовании рассмотрена динамика изменения состояния не только импринтированных участков генома, но и неимпринтированных моноаллельно метилированных в норме участков. Наблюдаемая динамика позволяет также предполагать участие нарушений копийности в формировании опухолевых специфичных профилей метилирования нормально моноаллельно метилированных локусов, как это было показано для импринтированных CpG-островков.

Заключение

Нами впервые проведено исследование динамики моноаллельного метилирования ДНК при РМЖ на основе результатов широкогеномного бисульфитного секвенирования фракции генома, обогащенной CpG-островками. Наблюдаемый характер изменений уровня метилирования позволяет предположить, что его динамика в умеренно метилированных опухолях, в основном, диктуется процессами, не определяющими

вектор изменения уровня метилирования, а в гиперметилированных — дополнительно направленным процессом, повышающим уровень метилирования CpG-динуклеотидов. По аналогии с ранее опубликованными результатами исследования динамики изменений метилирования импринтированных локусов в опухолях человека, мы предполагаем, что случайность направления изменения уровня метилирования обусловлена нарушениями копийности участков моноаллельного метилирования ДНК.

Благодарности. Высокопроизводительное секвенирование ДНК выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Геном» ФГБНУ «МГНЦ».

Литература/References

1. Gimelbrant A., Hutchinson J.N., Thompson B.R., Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*. 2007;318(5853):1136-1140.
2. Fedoriw A., Mugford J., Magnuson T. Genomic imprinting and epigenetic control of development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(7):a008136.
3. Steyaert S., Van Criekinge W., De Paepe et al. SNP-guided identification of monoallelic DNA-methylation events from enrichment-based sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42(20):e157.
4. da Rocha S.T., Gendrel A.V. The influence of DNA methylation on monoallelic expression. *Essays in biochemistry*. 2019;63(6):663-676.
5. Milani L., Lundmark A., Nordlund J. et al. Allele-specific gene expression patterns in primary leukemic cells reveal regulation of gene expression by CpG site methylation. *Genome research*. 2009;19(1):1-11.
6. Fraenkel S., Mostoslavsky R., Novobrantseva et al. Allelic choice governs somatic hypermutation in vivo at the immunoglobulin κ -chain locus. *Nature immunology*. 2007;8(7):715-722.
7. Lomvardas S., Barnea G., Pisapia D.J. et al. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*. 2006;126(2):403-413.
8. Serre D., Lee B.H., Ting A.H. MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic acids research*. 2010;38(2):391-399.
9. Harris R.A., Wang T., Coarfa C. et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1097-1105.
10. Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Research and Human Genetics*. 2008;11(3):249-256.
11. Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I. et al. Genome-wide methylotyping resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives. *Epigenomics*. 2019;11(6):605-617.
12. McCabe M.T., Brandes J.C., Vertino P.M. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(12):3927-3937.
13. Scala G., Federico A., Palumbo D., Cocozza S., Greco D. DNA sequence context as a marker of CpG methylation instability in normal and cancer tissues. *Scientific reports*. 2020;10(1): 1-11.
14. Martin-Trujillo A., Vidal E., Monteagudo-Sánchez A. et al. Copy number rather than epigenetic alterations are the major dictator of imprinted methylation in tumors. *Nature communications*. 2017;8(1):1-12.