

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.08.20-29>

Метод анализа метилирования CpG-островка, принадлежащего промоторной области гена MGMT, с использованием таргетного клонального бисульфитного секвенирования ДНК нового поколения

Мусатова В.В., Николаева А.Ф., Петрова К.О., Алексеева Е.А.

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

Проведено сравнение методов секвенирования по Сэнгеру, секвенирования нового поколения и метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР) с целью определения метилированного состояния целевого локуса. Обсуждается клиническая значимость получаемых расхождений в приложении к определению статуса метилирования промоторной области гена *MGMT* при глиобластоме. Показано, что для МЧ-ПЦР характерны ложноотрицательные результаты, а также сложна оценка низких уровней метилирования, не имеющих клинической значимости. Секвенирование по Сэнгеру не даёт возможности профилирования отдельных клеточных клонов, требует отдельного программного обеспечения для количественной оценки метилирования. Для рутинной лабораторной практики предложена технология таргетного клонального бисульфитного секвенирования ДНК с использованием метода секвенирования нового поколения для определения статуса метилирования CpG-островка, включающего в свой состав промоторную область гена *MGMT*. Рекомендовано использование прибора Ion Torrent PGM для избегания расчёта поправочных коэффициентов на определение смещения уровня метилирования.

Ключевые слова: CpG-пары, 5mC, *MGMT*, бисульфитное секвенирование, секвенирование следующего поколения, глиобластома.

Для цитирования: Мусатова В.В., Николаева А.Ф., Петрова К.О., Алексеева Е.А. Метод анализа метилирования CpG-островка, принадлежащего промоторной области гена *MGMT*, с использованием таргетного клонального бисульфитного секвенирования ДНК нового поколения. *Медицинская генетика* 2023; 22(8): 20-29.

Автор для корреспонденции: Мусатова В.В.; **e-mail:** Shkarupo@mail.ru

Финансирование. Государственное задание Министерства науки и высшего образования для ФГБНУ МГНЦ.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 01.08.2023

Method for the analysis of methylation of the CpG island belonging to the promoter region of the MGMT gene using targeted new generation clonal bisulfite DNA sequencing

Musatova V.V., Nikolaeva A.F., Petrova K.O., Alekseeva E.A.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

Sanger sequencing, next generation sequencing, and methyl-sensitive PCR were compared to determine the methylated state of the target locus. The clinical significance of the resulting discrepancies in application to determining the methylation status of the promoter region of the *MGMT* gene in glioblastoma is discussed. It has been shown that MP-PCR is characterized by false-negative results, and it is also difficult to assess low levels of methylation that do not have clinical significance. Sanger sequencing does not allow profiling individual cell clones and requires separate software to quantify methylation. For routine laboratory practice, a technology of targeted clonal bisulfite DNA sequencing was proposed using a new generation sequencing method to determine the methylation status of a CpG island that includes the *MGMT* gene promoter region. The use of the Ion Torrent PGM is recommended to avoid calculating correction factors for methylation bias.

Keywords: CpG pairs, 5mC, *MGMT*, bisulfite sequencing, next generation sequencing, glioblastoma.

For citation: Musatova V.V., Nikolaeva A.F., Petrova K.O., Alekseeva E.A. Method for the analysis of methylation of the CpG island belonging to the promoter region of the *MGMT* gene using targeted new generation clonal bisulfite DNA sequencing. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(8): 20-29. (In Russ.)

Corresponding author: Musatova V.V.; **e-mail:** Shkarupo@mail.ru

Funding. The work was supported by the state task of the Ministry of Science and Higher Education for Research Centre for Medical Genetics.

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

Accepted: 01.08.2023

Введение

Глиобластома представляет собой наиболее распространённую злокачественную опухоль головного мозга у взрослых. Пациенты с глиобластомой — одна из самых тяжелых групп больных, так как симптомы болезни чрезвычайно ухудшают качество жизни. Это заболевание имеет агрессивное течение, медиана выживаемости в некоторых случаях составляет всего 8 месяцев [1].

Несмотря на быстро расширяющийся спектр новых биопрепаратов и иммунотерапии в лечении рака, стандартная адъювантная химиотерапия с темозоломидом (алкилирующим препаратом 2-го поколения) остаётся единственной системной терапией с преимуществом в выживаемости при глиобластоме [2].

По большей части положительный эффект темозоломида на выживаемость получен у пациентов с глиобластомой, у которых имеется метилирование промотора гена *MGMT*. Ген *MGMT*, расположенный на хромосоме 10q26.3, кодирует высоко консервативный и повсеместно экспрессируемый фермент, участвующий в репарации ДНК. Уровень активности фермента репарации ДНК O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*) в клетках опухоли является основным фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию темозоломида. Повреждающее действие темозоломида осуществляется посредством присоединения алкильных групп к азотистым основаниям ДНК в различных позициях. Однако основное цитотоксическое действие темозоломида, главным образом, обусловлено метилированием гуанина в позиции O⁶. В процессе репликации ДНК модифицированный гуанин преимущественно спаривается с тиминном, что приводит к активации системы репарации неспаренных нуклеотидов. Поскольку эта система репарации корректирует только вновь синтезированную дочернюю цепь ДНК, на материнской цепи по-прежнему остается O⁶-алкилгуанин. Это приводит к повторным неэффективным циклам репарации неспаренных нуклеотидов. Появление O⁶-алкилгуанина на противоположных цепях ДНК ведет к образованию двухцепочечных разрывов в процессе неэффективных циклов репарации, что, в конечном счете, активирует апоптоз. Таким образом, высокая активность *MGMT* в клетках опухоли ассоциирована с резистентностью к лечению темозоломидом. Снижение или потеря экспрессии гена *MGMT* происходит за счет метилирования CpG-островка в промоторе гена. Следовательно, метилирование промотора гена *MGMT* вызывает потерю/низкий

уровень функционального белка *MGMT*, вызывая тем самым неадекватную репарацию алкилирования ДНК в ответ на алкилирующую химиотерапию [3].

На сегодняшний день статус *MGMT* измеряется на уровне белка с использованием иммуногистохимии (ИГХ), на уровне РНК — методом количественной ПЦР в реальном времени (Q-RT-PCR), на уровне ДНК исследование состояния метилирования промоторной области гена *MGMT* проводят методами метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР), qPCR с этапом чувствительного к метилированию плавления с высоким разрешением, пиросеквенирования или профилирования метилирования с помощью массива Illumina BeadChip [4].

Оценка статуса *MGMT* на уровне белка или РНК при дифференциации прогностической ценности не позволяет предсказывать выживаемость из-за разнящейся внутри- и межоператорской воспроизводимости [5, 6].

Определение метилирования методами МЧ-ПЦР и qPCR с этапом чувствительного к метилированию плавления с высоким разрешением также имеет свои ограничения. В частности, МЧ-ПЦР позволяет определить метилирование только CpG-пар, входящих в сайты узнавания используемой рестриктазы. Кроме того, метод зависит от «работоспособности» самого фермента. Основным недостатком метода МЧ-ПЦР является качественное определение уровня метилирования, отсутствие возможности получения профиля CpG-пар и точной информации о процентном содержании клеток с метилированием в образце опухоли. При qPCR с этапом чувствительного к метилированию плавления с высоким разрешением возникают затруднения при воспроизведении результатов и ограничения по получаемой информации. При анализе сканов можно не получить однозначных пиков, могут присутствовать неспецифические пики. Амплификация с использованием праймеров без CpG дает смещение ПЦР в сторону неметилированной последовательности. Метод также не даёт возможности профилирования CpG-пар, а содержание клеток с метилированием определяется на основании калибровочных кривых, построенных с использованием контрольных материалов, представляющих собой тотально метилированные и тотально деметилированные образцы в различных соотношениях, что не является совершенной моделью для оценки реального биологического материала, демонстрирующего дифференциально метилированные профили.

Метилирование промотора гена *MGMT* не является качественным признаком только с двумя параметрами: наличие/отсутствие, необходимы количественные измерения.

В одном из ретроспективных исследований методом пиросеквенирования было проанализировано 48 пациентов с глиобластомой, пороговое значение с лучшим прогнозом было установлено на уровне 7% метилирования *MGMT* [7]. В другом исследовании установлено пороговое значение на уровне 9% [8]. Исследования также обнаружили «серую зону», которая наблюдается примерно у 10% пациентов. Пациенты с гиперметилированной и «серой зоной» *MGMT* имеют лучший прогноз, чем пациенты с неметилированным статусом *MGMT* [9]. В последние годы в исследованиях были предприняты попытки измерить метилирование *MGMT* во внеклеточной ДНК (вкДНК) с использованием МЧ-ПЦР или пиросеквенирования. Хотя результаты пиросеквенирования вкДНК коррелируют с общей и безрецидивной выживаемостью, оба метода имеют низкую чувствительность и высокую отрицательную прогностическую ценность [10].

Пиросеквенирование в настоящее время считается наиболее надежным методом количественного измерения статуса метилирования, однако подходы к использованию метода несколько различаются [7, 11].

Целью настоящего исследования была разработка для рутинной лабораторной практики быстрого и недорогого метода анализа метилирования гена *MGMT* с использованием таргетного клонального бисульфитного секвенирования ДНК нового поколения.

Методы

Выделение ДНК

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из фиксированных формалином тканей опухолей, заключённых в парафиновые блоки. Выделение ДНК проводилось с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen. Для выделения геномной ДНК с целью уменьшения количества артефактов секвенирования использованы коммерческие наборы, содержащие урацил-ДНК-гликозилазу.

Бисульфитная конверсия ДНК

Бисульфитная конверсия ДНК проводилась с использованием набора EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit. Требуемое количество ДНК на входе 100 пкг–2 мкг, что делает возможным использование для анализа следовых количеств биологических тканей. В основу конверсии положена трёхэтапная обработка неметилированных цитозинов: сульфирование с образованием 5,6-дигидроцитозин-6-сульфоната, гидролитическое деаминирование с образованием 5,6-дигидроура-

цил-6-сульфоната и последующее щелочное десульфирование с образованием урацила. Первые два этапа проходят в пробирке, последний требует позиционирования ДНК на колонках. Эффективность конверсии составляет 99,5%.

МЧ-ПЦР

Геномную ДНК материала опухоли пациента (со средней концентрацией 100 нг/мкл) — 16 мкл обрабатывали метилчувствительной рестриктазой HpaII — 2мкл; буфер 10x SEBuffer B — 2мкл; смесь инкубировали при 37°C в течение 6–16 часов.

Для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов разработаны мультилокусные ПЦР для трех пар праймеров, где один фрагмент принадлежит исследуемому гену *MGMT* (F: tgccggcgctccagcgaggatg, R: aggcgacccagacactcaccac), а два других служат в качестве внутренних контролей эффективности ПЦР (амплифицируют конститутивно метилированный участок гена *CUX1*) и полноты гидролиза ДНК (конститутивно неметилированный участок гена *SNRK*).

ПЦР промоторной области гена *MGMT* проводится в реакционной смеси следующего состава: 1x буфер для Taq-полимеразы, 2 mM MgCl₂, по 200мкМ каждого dNTP, 10% диметилсульфоксид, по 10 пМ каждого праймера, 1 е.а. термостабильной Taq-полимеразы.

Программа ПЦР для амплификации фрагментов опухолевой ДНК, обработанной метилчувствительной рестриктазой HpaII): первичная денатурация при 95°C 2 мин, 33 цикла (денатурация при 95°C 50с, отжиг праймеров при 68°C 40с, элонгация цепи при 72°C 30с) и финальная элонгация 72°C 5 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили в ПААГ (рис. 1).

Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру было проведено по стандартному протоколу на ДНК-анализаторе Applied Biosystems 3500xL (Thermo Fisher, США). Оценка содержания метилированного цитозина проводилась с использованием специализированного программного обеспечения SeqBase [12].

Разработка праймеров таргетного бисульфитного секвенирования на платформе Ion Torrent

Был использован авторский подход для создания библиотек целевых фрагментов: амплификация фрагмента с праймеров, в которых некоторые тиминные основания заменены на урациловые с целью последующей

эксцизии синтетического олигонуклеотида для исключения контаминации продуктами первого этапа. В этом случае дизайн праймера имеет ряд обязательных требований: для амплификации бисульфит-конвертированной ДНК требуются праймеры от 19 до 32 оснований; все С следует рассматривать как Т для целей дизайна праймеров, если только они не находятся в контексте CpG; если праймер содержит динуклеотиды CpG с неопределенным статусом метилирования, то можно использовать смешанные основания с С и Т (или G и A); обычно в праймере должно быть не более одной смешанной позиции, и она должна располагаться ближе к 5'-концу праймера (не рекомендуется располагать смешанные основания на 3'-конце праймера); замена тимина на дезоксиурацил (dU) проводится для 60-100% оснований, не входящих в состав смешанных позиций, а также, не располагающихся на 3'-конце праймера.

В работе были использованы праймеры [13]:

MGMT1F 5' – GGGGUTTTUGATUAGGGGAG – 3'

MGMT1R 5' – CCTTTTCCTAUCACAAAAUAAUC – 3'

MGMT2F 5' – ATTTTGTUGAUAGGAAAAGGUA – 3'

MGMT2R 5' – AAAACCUAAAAAACAACAAAAA – 3'

Реакция ПЦР проводилась с использованием термостабильной Taq-полимеразы SynTaq (Синтол, Россия), которая обеспечивает стабильную работу и высокую продуктивность на GC- и AT-богатых матрицах, включая реализацию возможности мультиплексирования таргетных локусов, и обладает высокой чувствительностью к низкому содержанию ДНК в образце.

Рекомендованный состав ПЦР смеси: dNTP 2,5мМ 2,5 мкл, 10x PCR 2,5 мкл, MgCl₂, 25мМ 1,5 мкл, SynTaq 5Е/мкл 0,3 мкл, смесь праймеров 1 мкл, ДНК 1,5 мкл, mQ до 25 мкл

Рекомендованная программа ПЦР для амплификации бисульфитмодифицированных фрагментов (диапазон температур охватывает как амплификацию бисульфитмодифицированных, так и не модифицированных фрагментов ДНК): первичная денатурация 95°C 5 мин, 33 цикла (денатурация 95°C 40с, отжиг праймеров 57°C 30с, элонгация цепи 72°C 40с) и финальная элонгация 72 °C 5 мин.

Обработка фрагментов, амплифицированных с праймеров

Проводилась обработка фрагментов, амплифицированных с праймеров, в которых некоторые тиминные основания заменены на урациловые, ферментами, позволяющими удалить синтетические последова-

тельности из продукта ПЦР при последующем анализе. Для редукции праймеров использовали смесь ферментов для формирования однонитевых разрывов в местах расположения урациловых оснований. Смесь ферментов представляет собой смесь урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и ДНК-гликозилазы-лиазы эндонуклеазы VIII. УДГ катализирует иссечение урацилового основания, образуя абазический (апиримидиновый) сайт, оставляя при этом фосфодиэфирный остов без изменений. Лиазная активность ДНК-гликозилазы-лиазы эндонуклеазы VIII разрушает фосфодиэфирный остов на 3'- и 5'-сторонах абазического участка так, что высвобождается дезоксирибоза без основания.

Экспериментальным путём было установлено, что данная смесь ферментов чувствительна к содержанию Mg²⁺, поэтому ПЦР-реакция должна проводиться с использованием буфера для ПЦР, не содержащего Mg²⁺. В работе использован HS (hot start) буфер.

Обработка ампликона комплексом ферментов УДГ и ДНК-гликозилазы-лиазы эндонуклеазы VIII приводит к укорочению модельного фрагмента, равному суммарной длине частей обоих праймеров от их 5'-концов до последних позиций урацила на 3'-концах. Отсут-

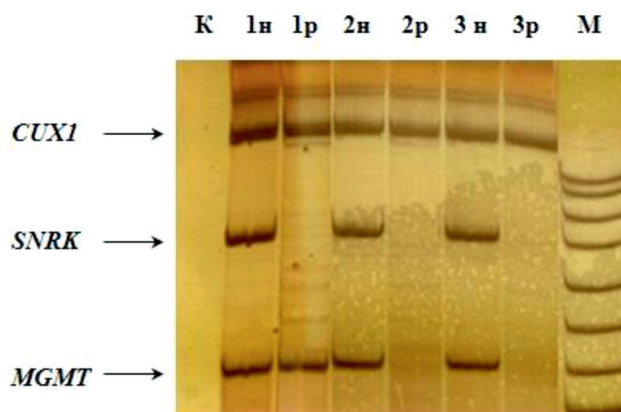


Рис. 1. Пример электрофореграммы, демонстрирующей результаты МЧ-ПЦР промоторной области гена *MGMT*. Обозначения: p – ДНК после гидролиза рестриктазой HpaII, n – ДНК, не гидролизованная HpaII; K – отрицательный контроль; M – маркер молекулярного веса PUC19/MspI. Выявлено метилирование промотора гена *MGMT* в образце №1 и отсутствие метилирования в остальных образцах.

Fig. 1. An example of an electrophoregram of the results of methyl-sensitive PCR of the *MGMT* gene promoter. Designations: p – DNA after hydrolysis with HpaII, n – DNA not hydrolyzed with HpaII; K – negative control; M – PUC19/MspI molecular weight marker. Methylation of the *MGMT* gene promoter was detected in sample No. 1 and there was no methylation in the remaining samples.

ствие рестрикции модельного фрагмента свидетельствует об инактивации комплекса и неэффективности дальнейшей обработки продукта. Лигирование полученного продукта универсальными адаптерами приводит к созданию фрагментов библиотеки ДНК, пригодных для дальнейшего клонального секвенирования.

Секвенирование полученных библиотек

Секвенирование полученных библиотек реализуется на приборе Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) по протоколу Tanas с соавт., 2017 [14].

Статистическая обработка

Объектом статистической обработки служили CpG-пары изучаемых областей, была обработана информация о статусе метилирования 456 CpG-пар из 6 образцов. Был определён характер распределения уровня метилирования в образцах, в соответствии с этим определялись числовые характеристики выборки (медиана, 25 и 75 квартили). Сравнение метилирования в локусах F1 и F2 было проведено методом Манна–Уитни. Для определения корреляции результатов секвенирования на платформах Ion Torrent S5 и PGM был использован непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

Сравнение подходов к определению метилирования промоторного участка гена *MGMT* было проведено на результатах, полученных при секвенировании анализируемого локуса по Сэнгеру («золотой стан-

дарт»), технологией таргетного клонального бисульфитного секвенирования ДНК с использованием метода секвенирования нового поколения (NGS) F2- (chr10:131,265,097-131,265,400) и МЧ-ПЦР фрагмента (chr10:131,265,234-131,265,579), пересекающегося с исходным на 28% (рис. 2). Область пересечения состоит из 166 нуклеотидов и включает в себя 5 сайтов узнавания рестриктазы HpaII из 6, расположенных в таргетной области МЧ-ПЦР. Таким образом, сходимость области праймеров F2 с областью МЧ-ПЦР составляет 83%. Кроме того, методами NGS и секвенирования по Сэнгеру исследован ещё один локус с координатами F1-(chr10:131,264,913-131,265,077), не имеющий общих точек с продуктом МЧ-ПЦР, но также принадлежащий промоторному CpG-островку гена *MGMT*.

Всего в анализ методами секвенирования по Сэнгеру и NGS вошло 76 CpG-пар, принадлежащих промоторному CpG-островку (рис. 3). Была проведена оценка статуса метилирования каждого из 76 локусов в 6 биопсийных образцах пациентов с глиобластомами. Для определения статуса метилирования образца при NGS были использованы значения медианы, а также верхнего и нижнего квартилей метилирования 50 CpG-пар, принадлежащих локусу chr10:131,265,234-131,265,579. При проведении секвенирования по Сэнгеру статус метилирования устанавливался полуколичественно по соотношению высоты пиков, при МЧ-ПЦР – качественно, при анализе изображения на ПААГ (рис. 1).

Кроме того, была измерена корреляция между определением уровня метилирования с использованием платформ Ion Torrent S5 и PGM. Последняя

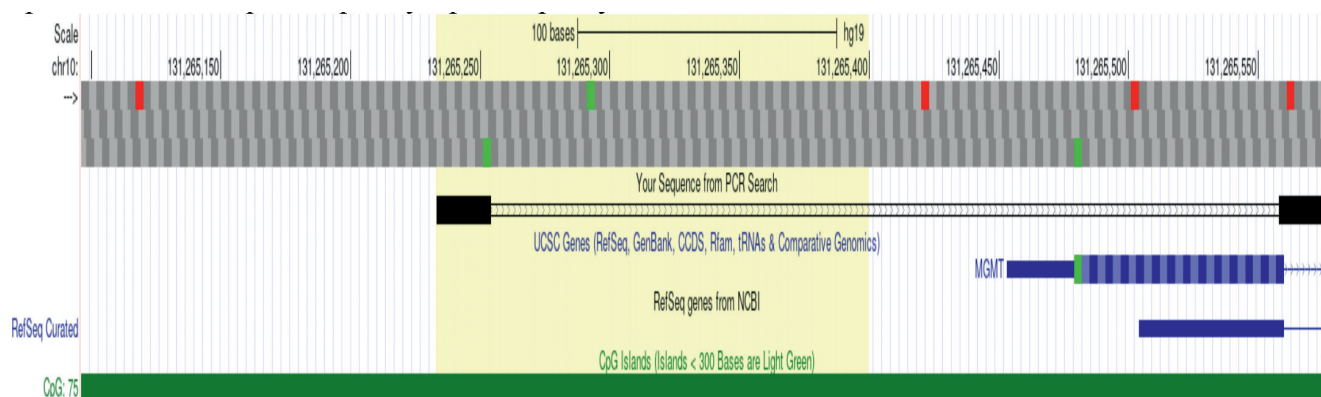


Рис. 2. Область пересекающихся значений для методов секвенирования последовательности по Сэнгеру и МЧ-ПЦР (выделено цветом).

Fig. 2. Area of overlap for Sanger sequencing and methyl-sensitive PCR (highlighted in color).

обладает возможностью ручной загрузки, что позволяет прогревать чип перед загрузкой в прибор, предотвращая слипание фрагментов библиотек и преимущественную амплификацию метилированных CpG-пар. Проблема преимущественной идентификации метилированного цитозина актуальна и для секвенирования по Сэнгеру, отчасти это решается использованием специализированного программного обеспечения, например, SeqBase [12]. Показано, что для неметилированных или низко-метилированных образцов смещение показателя метилирования не является клинически значимым (обр1, обр3, обр5). Для высоко-метилированного образца смещение не выражено (обр2). Однако в «серой зоне» (обр4, обр6) значение метилирования выражено смещается в сторону завышения значений при использовании IonTorrent S5. Продемонстрированы высокие значения коэффициентов корреляции (табл. 1), то есть линейной зависимости изменения процента метилирования при проведении анализа на различных платформах. Однако для избегания расчёта «поправочных» коэффициентов рекомендуется проводить анализ на IonTorrent PGM.

МЧ-ПЦР позволяет определять статус метилирования только тех CpG-пар, которые входят в сайт уз-

навания рестриктазы HpaII CCGG, метилированный статус позиционируется в том, случае, если ВСЕ сайты HpaII, входящие в состав ПЦР-продукта метилированы. Среди дифференциально метилированных HpaII-сайтов методологически нельзя найти различия, и образец будет определён как неметилированный. Для МЧ-ПЦР достаточно 100% рестрикции хотя бы одного сайта узнавания рестриктазы для того, чтобы убрать матрицу для амплификации, поэтому здесь не будет учитываться дифференциальный профиль, хорошо заметный при NGS.

Сравнение с МЧ-ПЦР выявило расхождение в области «серой зоны»: один из пациентов по результатам NGS PGM имел статус met (16,7%), тогда как другой со сходными показателями (15,5%) был идентифицирован методом МЧ-ПЦР как unmet (табл. 1, 2): из 5 общих сайтов CCGG 3 показали неметилированное состояние, на основании чего методом МЧ-ПЦР получен отрицательный результат. При этом метилирование других сайтов методом NGS было определено на уровне 12,5% и 28,5%, что является высокими показателями. Другой образец (обр1), показавший met статус при исследовании всеми методами, имел медиану метилирования 2,7%, это выявляется только при использова-

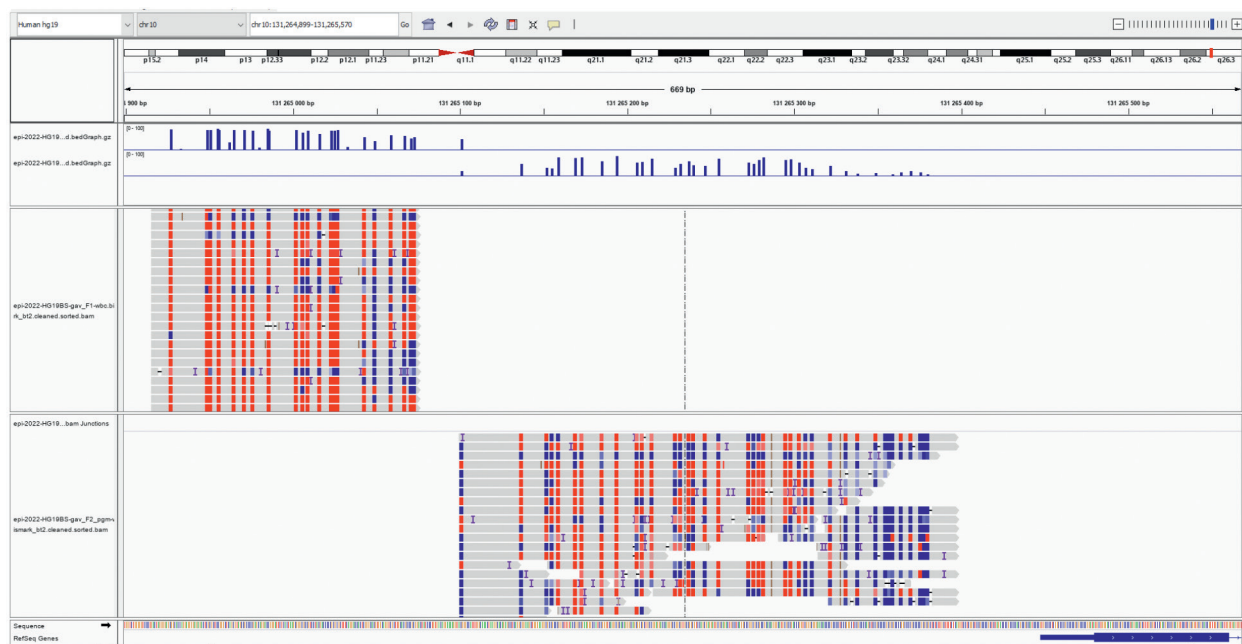


Рис. 3. Статус метилирования 76 CpG-пар, полученных методом клонального бисульфитного секвенирования фрагмента бисульфит-модифицированной ДНК, принадлежащего участку CpG-островка промоторной области гена *MGMT*.

Fig. 3. Methylation status of 76 CpG pairs obtained by clonal bisulfite sequencing of a bisulfite-modified DNA fragment belonging to the CpG island region of the *MGMT* gene promoter region.

нии секвенирования методом NGS и клинически приравнивается к неметилированному состоянию. Таким образом, безусловный статус метилирования этого об-

Таблица 1. Результаты определения метилирования, полученные на приборах Ion S5 и Ion PGM

Table 1. Methylation assessment obtained on Ion S5 and Ion PGM

	Me [25%;75%] PGM	Me [25%;75%] S5	Коэффициент Корреляции, <i>p</i>
обр1	2,7 [2,4;4,0]	4,4 [3,0;4,7]	0,227, нд
обр2	52,9 [16,7;75,0]	46,5 [11,9;74,5]	0,946, <0,05
обр3	0,0 [0,0;0,0]	0,0 [0,0;0,0]	0,54, <0,05
обр4	16,7 [5,6;32,3]	36,4 [11,8;65,2]	0,872, <0,05
обр5	0,0 [0,0;0,0]	0,0 [0,0;2,6]	0,301, нд
обр6	15,5 [0,0;28,6]	42,2 [12,2;57,9]	0,75, <0,05

Примечание. Курсивом обозначены статистически значимые коэффициенты корреляции.

Таблица 2. Сравнение результатов определения метилирования, полученных методами NGS, МЧ-ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

Table 2. Comparison of methylation assessment obtained by NGS, methyl-sensitive PCR and Sanger sequencing.

	PGM	МЧ-ПЦР	Секвенирование по Сэнгеру
обр1	met	met	met
обр2	met	met	met
обр3	unmet	unmet	unmet
обр4	met	met	met
обр5	unmet	unmet	unmet
обр6	met	unmet	met

Таблица 3. Медиана значений уровня метилирования, определённая для локусов F2 и F1.

Table 3. Median methylation levels for the F2 and F1 loci.

	Me [25%;75%]_F2	Me [25%;75%]_F1	<i>p</i>
обр1	2,7 [2,4;4,0]	44,8 [13,7;55,5]	<0,0001
обр2	52,9 [16,7;75,0]	70,4 [44,2;76,1]	0,059
обр3	0,0 [0,0;0,0]	13,4 [7,6;39,9]	<0,0001
обр4	16,7 [5,6;32,3]	50,0 [43,7;61,9]	<0,0001
обр5	0,0 [0,0;0,0]	5,8 [2,8;26,4]	<0,0001
обр6	15,5 [0,0;28,6]	51,1 [34,5;68,1]	<0,0001

Примечание. Курсивом обозначены статистически значимые различия.

разца, обнаруженный методом МЧ-ПЦР, можно считать ложноположительным.

При сравнении данных NGS с данными, полученными методом секвенирования по Сэнгеру, были идентичны не только результаты по интегральному показателю метилирования, но также были сходны профили при высоком проценте метилирования (рис. 4), однако необходимо дополнительное программное обеспечение [12] для точной количественной оценки процентного содержания клеток с метилированием, это наиболее актуально для неметилированного состояния образца, за которое принимается среднее содержание метилированных CpG-пар менее 7–9%, и «серой зоны» – до 17–19%.

Кроме того, при проведении секвенирования по Сэнгеру без использования специализированного программного обеспечения не идентифицируется метилирование CpG-пар со значением менее 30% (рис. 4), а также нет возможности оценки клонального состава образца за счёт сравнения профиля метилированных CpG-пар в различных прочтениях (рис. 5).

При изучении статуса метилирования областей F1 и F2 было отмечено, что метилирование локуса, располагающегося в 3'-конце изучаемой области chr10:131,264,913–131,265,077, было положительным во всех обследованных образцах, тогда как участок, располагающийся ближе к промоторной области гена *MGMT*, показал различное состояние статуса метилирования (табл. 3).

Дифференциальное метилирование областей F1 и F2 подтверждает различную функциональную ценность участка, несмотря на его небольшую протяженность, и необходимость точного количественного определения уровня метилирования заданных областей.

Обсуждение

Основная задача предлагаемого подхода состоит в анализе маркера метилирования ДНК, располагающегося в области промотора гена *MGMT*, с целью использования в клинической практике для оценки возможного ответа злокачественной опухоли на проводимую терапию, степени прогрессии злокачественной опухоли в процессе лечения. При сравнении локусов, дающих наиболее репрезентативную оценку метилирования промотора гена *MGMT*, был выбран локус, имеющий локализацию chr10:131,265,097–131,265,400. МЧ-ПЦР дает больше возможностей для удачного «наложения» праймеров, так как не требует обработки

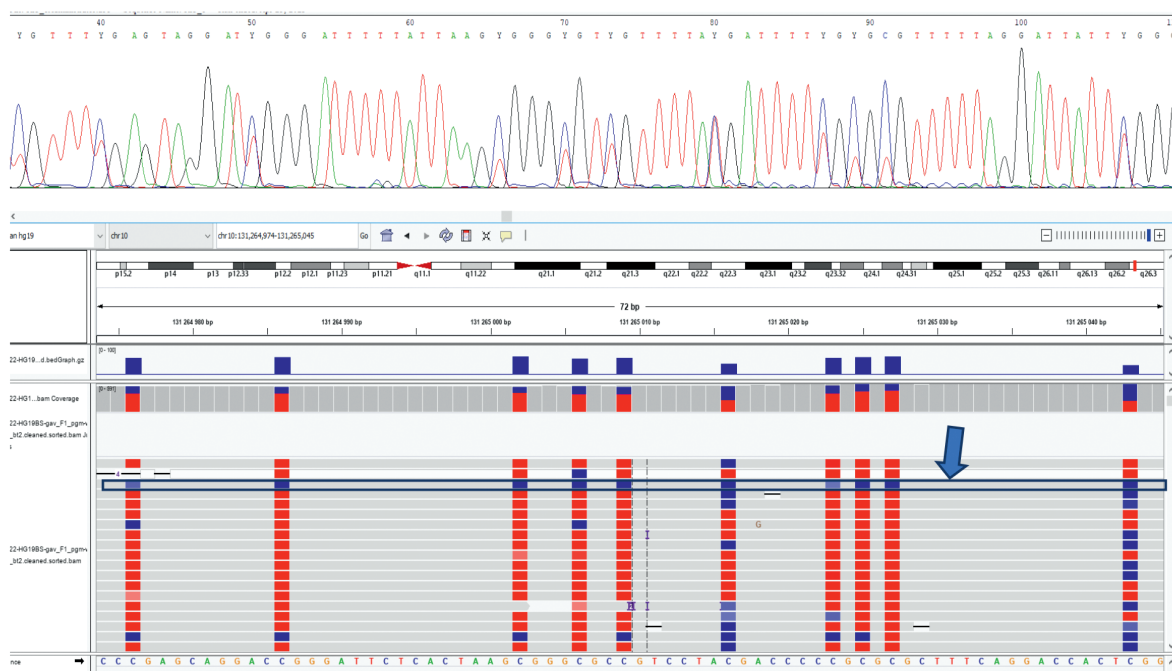


Рис. 4. Сопоставление результатов определения метилирования, полученных методами секвенирования по Сэнгеру и NGS. Выделенная синим прямоугольником и обозначенная стрелкой область – прочтение с аномальным профилем (деметилованный статус всех CpG-пар при общем высоко-метилованном статусе образца).

Fig. 4. Comparison of methylation assessment obtained by Sanger sequencing and NGS. The area highlighted with a blue rectangle and marked with an arrow is a reading with an abnormal profile (demethylated status of all CpG pairs with an overall high-methylated status of the sample).

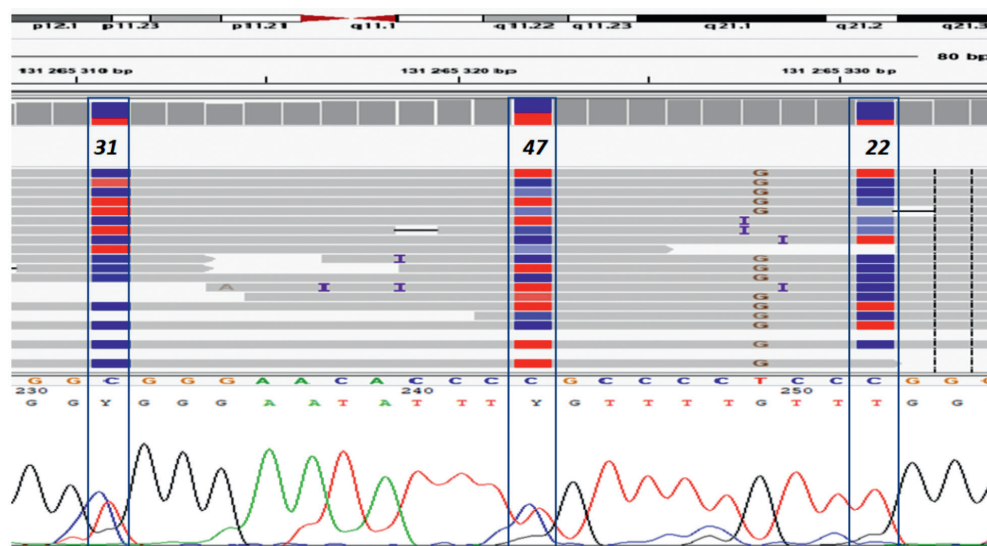


Рис. 5. Варианты пороговой чувствительности методов NGS и секвенирования по Сэнгеру (выделенные области: 31, 47 и 22% метилирования).

Fig. 5. Variants of threshold sensitivity of NGS and Sanger sequencing methods (highlighted areas: 31, 47 and 22% methylation).

первичного материала бисульфитом Na, поэтому для большей клинической чувствительности метода NGS рекомендованы праймеры, имеющие максимально пересекющуюся область с целевым участком, анализируемым методом МЧ-ПЦР. По сравнению с методом МЧ-ПЦР подход обладает большей чувствительностью (позволяет находить метилирование в дифференциально метилированных областях) и специфичностью (константно метилированные по профилю образцы, однако демонстрирующие <7-9% метилирования, не имеющие клинической значимости, которые можно отнести в группу unmet). Метод таргетного клонального бисульфитного секвенирования даёт более точную количественную оценку, чем секвенирование по Сэнгеру. При классическом подходе секвенирование по Сэнгеру остаётся полуколичественным методом, не позволяющим выявлять уникальные профили метилирования, что является важным моментом при выявлении отдельных клонов опухоли с целью оценки терапевтической чувствительности глиобластомы. Однако необходимы дополнительные исследования на большей выборке образцов для формирования чёткого методического подхода к выделению отдельных клеточных клонов.

Литература

- Ostrom Q.T., Patil N., Cioffi G., Waite K., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol.* 2020;22(12 Suppl 2):iv1-iv96. doi: 10.1093/neuonc/noaa200.
- Kotecha R., Odia Y., Khosla A.A., Ahluwalia M.S. Key Clinical Principles in the Management of Glioblastoma. *JCO Oncol Pract.* 2023;19(4):180-189. doi: 10.1200/OP.22.00476.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., et al: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352:997-1003.
- Liu D., Yang T., Ma W., Wang Y. Clinical strategies to manage adult glioblastoma patients without MGMT hypermethylation. *J Cancer.* 2022;13(1):354-363. doi: 10.7150/jca.63595.
- Dupont J.-M., Tost J., Jammes H., Gut I.G. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem.* 2004;333:119-27, doi: 10.1016/j.ab.2004.05.007.
- Mikeska T., Bock C., El-Maarri O., Hubner A., Ehrentauf D., Schramm J., et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn.* 2007;9:368-81, doi: 10.2353/jmoldx.2007.060167.
- Johannessen L.E., Brandal P., Myklebust T.Å., et al. MGMT gene promoter methylation status – Assessment of two pyrosequencing kits and three methylation-specific PCR methods for their predictive capacity in glioblastomas. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2018; 15:437-446.
- Lattanzio L., Borgognone M., Mocellini C., et al. MGMT promoter methylation and glioblastoma: A comparison of analytical methods and of tumor specimens. *Int J Biol Markers.* 2015; 30: e208-e216.
- Hegi M.E., Genbrugge E., Gorlia T., et al. MGMT Promoter Methylation Cutoff with Safety Margin for Selecting Glioblastoma Patients into Trials Omitting Temozolomide: A Pooled Analysis of Four Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 2018; 25:1809-1816.
- Estival A., Sanz C., Ramirez J.L., et al. Pyrosequencing versus methylation-specific PCR for assessment of MGMT methylation in tumor and blood samples of glioblastoma patients. *Sci Rep.* 2019; 9:11125.
- Della Monica R., Cuomo M., Buonaiuto M., et al. MGMT and Whole-Genome DNA Methylation Impacts on Diagnosis, Prognosis and Therapy of Glioblastoma Multiforme. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7148. doi: 10.3390/ijms23137148.
- Танас А.С., Симонова О.А., Абрамычева Н.Ю., Стрельников В.В. Совершенствование анализа результатов секвенирования ДНК по Сэнгеру: компьютерная программа SEQBASE. *Медицинская генетика.* 2021; 20(10):33-39, DOI: 10.25557/2073-7998.2021.10.33-39
- Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002;18(11):1427-31. doi: 10.1093/bioinformatics/18.11.1427.
- Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B., et al. Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing. *Epigenomics.* 2017; 9(6): 833-847.

References

- Ostrom Q.T., Patil N., Cioffi G., Waite K., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol.* 2020;22(12 Suppl 2):iv1-iv96. doi: 10.1093/neuonc/noaa200.
- Kotecha R., Odia Y., Khosla A.A., Ahluwalia M.S. Key Clinical Principles in the Management of Glioblastoma. *JCO Oncol Pract.* 2023;19(4):180-189. doi: 10.1200/OP.22.00476.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., et al: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352:997-1003.
- Liu D., Yang T., Ma W., Wang Y. Clinical strategies to manage adult glioblastoma patients without MGMT hypermethylation. *J Cancer.* 2022;13(1):354-363. doi: 10.7150/jca.63595.
- Dupont J.-M., Tost J., Jammes H., Gut I.G. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem.* 2004;333:119-27, doi: 10.1016/j.ab.2004.05.007.
- Mikeska T., Bock C., El-Maarri O., Hubner A., Ehrentauf D., Schramm J., et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn.* 2007;9:368-81, doi: 10.2353/jmoldx.2007.060167.
- Johannessen L.E., Brandal P., Myklebust T.Å., et al. MGMT gene promoter methylation status – Assessment of two pyrosequencing kits and three methylation-specific PCR methods for their predictive capacity in glioblastomas. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2018; 15:437-446.
- Lattanzio L., Borgognone M., Mocellini C., et al. MGMT promoter methylation and glioblastoma: A comparison of analytical methods and of tumor specimens. *Int J Biol Markers.* 2015; 30: e208-e216.
- Hegi M.E., Genbrugge E., Gorlia T., et al. MGMT Promoter Methylation Cutoff with Safety Margin for Selecting Glioblastoma Pa-

- tients into Trials Omitting Temozolomide: A Pooled Analysis of Four Clinical Trials. *Clin Cancer Res*. 2018; 25:1809–1816.
10. Estival A., Sanz C., Ramirez J.L., et al. Pyrosequencing versus methylation-specific PCR for assessment of MGMT methylation in tumor and blood samples of glioblastoma patients. *Sci Rep*. 2019; 9:11125.
 11. Della Monica R., Cuomo M., Buonaiuto M., et al. MGMT and Whole-Genome DNA Methylation Impacts on Diagnosis, Prognosis and Therapy of Glioblastoma Multiforme. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7148. doi: 10.3390/ijms23137148.
 12. Tanas A.S., Simonova O.A., Abramychева N.Yu., Strelnikov V.V. Sovershenstvovaniye analiza rezul'tatov sekvenirovaniya DNK po Sengeru: komp'yuternaya programma SEQBASE [Improving the Analysis of DNA Sanger Sequencing Results: SeqBase Computer Program]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2021;20(10):33-39. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2021.10.33-39>
 13. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002;18(11):1427-31. doi: 10.1093/bioinformatics/18.11.1427.
 14. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B., et al. Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing. *Epigenomics*. 2017; 9(6): 833-847.