

Новые маркёры аномального метилирования ДНК при остром миелоидном лейкозе у детей, идентифицированные непредвзятым скринингом дифференциального метилирования геномов*

Руденко В.В.^{1,2}, Немировиченко В.С.³, Танас А.С.^{1,2,4}, Попа А.В.³, Казакова С.А.¹, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,2,4}, Стрельников В.В.^{1,2,4}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, e-mail: tanas80@gmail.com

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический центр им. Н.Н. Блохина» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, Каширское ш., д. 24, e-mail: aropa@list.ru

⁴ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1, e-mail: zalnem@mail.ru

Методом непредвзятого скрининга дифференциального метилирования ДНК выявлены 16 новых геномных локусов, аномально метилированных при остром миелоидном лейкозе у детей. Практически все они принадлежат промоторным CpG-островкам генов, за исключением одного, принадлежащего межгенному CpG-островку на хромосоме 7p21.1. Два гена, аномальное метилирование которых при детском ОМЛ выявлено в работе, кодируют белки, вовлечённые в процессы эпигенетической регуляции экспрессии: рецептор ретиноидов RXRA, вовлечённый в посттрансляционную модификацию гистонов, и KHSRP/KSRP, связывающий аденин/урацил-богатые последовательности и регулирующий посттранскрипционную стабильность мРНК. Предложена система из 13 маркёров метилирования ДНК, соответствующих промоторным областям генов *EGFLAM*, *RXRA*, *MAFA*, *TMEM176A/TMEM176B*, *KHSRP*, *TMEM200B*, *ABCG4*, *GSG1L*, *CLDN7*, *CXCL14*, *DLK2*, *AIFM3* и *SOX8*, для определения минимальной остаточной болезни при детском остром миелоидном лейкозе.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз у детей, минимальная остаточная болезнь, дифференциальное метилирование ДНК, амплификация интерметилированных сайтов, непредвзятый скрининг дифференциального метилирования

Введение

Подавляющее большинство злокачественных новообразований характеризуется выраженной гетерогенностью на молекулярно-генетическом уровне. Мажорные геномные перестройки или мутации описаны далеко не для всех типов опухолей. Это затрудняет разработку молекулярных тестов для диагностики и прогноза течения онкологических заболеваний. Проблема актуальна и в диагностике острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей, опухоли миелоидного ростка кроветворения, встречающейся в 20% случаев всех острых лейкозов у детей. В патогенезе ОМЛ задействованы как минимум два типа совместных генетических событий. Первый тип событий заключается главным образом в индукции пролиферации. Генетические аномалии второго типа касаются факторов, отвечающих за созревание клеток [27]. По структуре, события первого и второго типа — это хромосомные аномалии и/или генные мутации. Цитогенетические aberrации в молекулярной патологии при ОМЛ выявляются в 50% случаев, генные мутации

обнаруживаются как в комплексе с ними, так и изолированно [6], но их совместная репрезентативность не превышает 60%. Такая ситуация создает значительные препятствия определению минимальной остаточной болезни (МОБ) молекулярно-генетическими методами. Под МОБ понимают небольшое количество опухолевых клеток, оставшееся в организме после достижения полной гематологической ремиссии [8]. В отличие от острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), уровень МОБ при ОМЛ у детей как самостоятельный прогностический критерий используется редко. Это происходит в основном из-за отсутствия стандартизированных методов оценки [35]. При этом критерий МОБ имеет серьёзные потенциальные прогностические возможности при терапии ОМЛ у детей. Значимость отслеживания МОБ как прогностического критерия при ОМЛ у детей заключается, во-первых, в определении курса постиндукционной химиотерапии, которая неразрывно связана с вероятностью возникновения опосредованного сепсиса. Во-вторых, критерий можно использовать как ран-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №14-04-32295 мол_а.

ную вспомогательную точку определения эффективности проводимого лечения. И, в-третьих, определение МОБ имеет значение при выборе вида трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Аллогенная трансплантация требует поиска совместимого донора, однако возможности аутологичной трансплантации ограничены высоким риском рецидивирования болезни, объясняющимся, в том числе наличием лейкозных клеток в трансплантате костного мозга.

В настоящее время МОБ при ОМЛ определяется путём детекции хромосомных перестроек методом FISH, выявлением мутантных и химерных генов методом количественной ПЦР (qPCR) и по иммунофенотипам лейкозных клеток. Основным преимуществом определения химерных генов, возникающих в результате хромосомных перестроек, методом FISH является однозначная идентификация конкретных нарушений в лейкозных клетках. Однако диагностическая (клиническая) чувствительность не превышает 50% [8], а аналитическая чувствительность сопоставима с таковой при морфологической идентификации бластных клеток. Оценка содержания лейкозных клеток на основе мутантных и химерных генов с помощью количественной ПЦР характеризуется аналитической чувствительностью (разрешающей способностью) в пределах от 1:10 000 в модельных исследованиях до 1:1000 в рутинной лабораторной практике. Лишь у 40–50% пациентов с ОМЛ находятся подходящие молекулярные мишени для проведения qPCR. Убедительнее всего клиническая значимость применения qPCR демонстрируется для острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), тактика лечения которого тесно связана с результатами измерения экспрессии химерного гена *PML-RARA* [22]. В качестве потенциальных диагностических мишеней qPCR при ОМЛ были предложены мутации в генах *FLT3*, *NPM1*, *MLL* и *CEBPA* [23], однако значимость при оценке МОБ с помощью qPCR была показана только для гена *NPM1* [39]. Определённые сложности при использовании метода связаны с исчезновением диагностических мишеней вследствие клональной эволюции, что способствует появлению ложноотрицательных результатов [9]. Для определения МОБ при детском ОМЛ с использованием иммунофенотипов лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии характерна диагностическая чувствительность 82,5% [12]. Аналитическая чувствительность метода зависит от количества клеток в образце, максимум (1:10 000) достигается при анализе 200 000 клеток. При проведении измерений отсутствует контрольный образец, таким образом, возникают ложноотрицательные и ложноположительные результаты. Появление ложноотрицательных результатов способствует фенотипический сдвиг иммунологических маркёров лейкозных клеток, который наблюдается у 91% пациентов в процессе лечения. Для нивелирования эффекта возникает необходимость использования нескольких панелей маркёров [5]. Стоимость лабораторных тестов с исполь-

зованием проточной цитометрии в основном определяется числом анализируемых маркёров, с этой точки зрения анализ МОБ при острых лейкозах с помощью данного метода становится дорогостоящей процедурой. Источником ложноположительных результатов служит явление «фоновой экспрессии» ряда aberrантных маркёров или их комбинаций на нормальных клетках [28], это особенно ощущается при увеличении чувствительности метода.

Одним из перспективных подходов к разработке методов определения МОБ при ОМЛ считается изучение метилирования ДНК, так как эпигенетические изменения, в частности нарушения метилирования ДНК, принимают участие в этиопатогенезе острых лейкозов наравне с генетическими механизмами [1, 2]. Общеизвестным механизмом инактивации генов-супрессоров опухолевого роста, в том числе при острых лейкозах, является гиперметилирование промоторных CpG-островков этих генов [4, 33]. В ряде работ продемонстрирована вовлечённость аномального метилирования в патогенез ОМЛ. В частности, аномальное метилирование промотора гена *DBC1* может использоваться как прогностический критерий безрецидивной выживаемости и общей продолжительности жизни у взрослых пациентов с ОМЛ, имеющих нормальный кариотип [3]. Кроме того, аномальное метилирование ДНК — наиболее частое молекулярное событие в процессе злокачественной трансформации клеток [16]. Недавние исследования показали, что в специфических генетических и цитогенетических подгруппах ОМЛ у взрослых идентифицируются специфические паттерны метилирования ДНК, более того, 5 подгрупп были определены исключительно по профилю метилирования [17], заполнив тем самым брешь молекулярно-генетических маркёров. Подводя итог вышесказанному, можно утверждать, что патогенетически обосновано использование в качестве способа определения МОБ эпигенетических изменений, так как эти явления лежат в основе нарушения функционирования онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста и носят частый характер в патогенезе острых лейкозов.

Материалы и методы

Образцы биологического материала костного мозга 14 пациентов с ОМЛ получены в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН. Забор материала проводили по схеме:

- 1) до начала индукционной терапии;
- 2) на 15-й день от начала первого курса индукции;
- 3) на 21-й день от окончания первого курса;
- 4) перед первым курсом постиндукционной химиотерапии;
- 5) перед вторым курсом постиндукционной химиотерапии;
- 6) перед третьим курсом постиндукционной химиотерапии;

7) перед четвёртым курсом постиндукционной химиотерапии.

В исследованной выборке пациентов с ОМЛ 36% — мальчики, 64% — девочки; средний возраст $7,3 \pm 3,2$ года. В выборке с наибольшей частотой представлен ОМЛ морфологического типа М1 (острый миелобластный лейкоз без созревания) — 28,6%. Также представлены морфологические варианты М0 (острый миелобластный лейкоз с минимальной дифференцировкой) — 7,1%, М2 (острый миелобластный лейкоз с созреванием) — 14,3%, М3 (острый промиелоцитарный лейкоз) — 7,1%, М4 (острый миеломоноцитарный лейкоз) — 14,3%, М5а (острый монобластный лейкоз) — 21,5% и М6 (острый эритроидный лейкоз) — 7,1%. По результатам цитогенетического исследования пациентов с неидентифицированной хромосомной патологией — 35,7%. Пациентов с неидентифицированной хромосомной патологией и подтипом М1 — 21,5%. Перестройка гена *MLL* t(9;11)(p22;q23) диагностирована у всех пациентов с М4 и М5а. Результаты иммунофенотипирования не противоречат данным морфологического исследования.

Определение МОБ методом иммунофенотипирования не проводилось.

Получены письменные согласия законных представителей пациентов на участие в исследовании и на публикацию информации о его результатах.

Гистологическую идентификацию проводили в Клинико-морфологическом отделении ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН». Данные иммунофенотипирования получены в лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН».

Для получения ДНК из тканей использовали метод фенол-хлороформной экстракции [38].

За основу методологической части работы приняли одну из техник поиска метилированных участков ДНК на уровне целого генома (так называемые техники «отпечатков») — метод амплификации интерметилированных сайтов (АИМС) [19]. Метод АИМС генерирует большое число фрагментов, отражающих профиль метилирования ДНК в клетке. На первом этапе ДНК обрабатывают метилчувствительной рестриктазой *Sma*I (сайт узнавания CCC/GGG), которая оставляет фрагменты

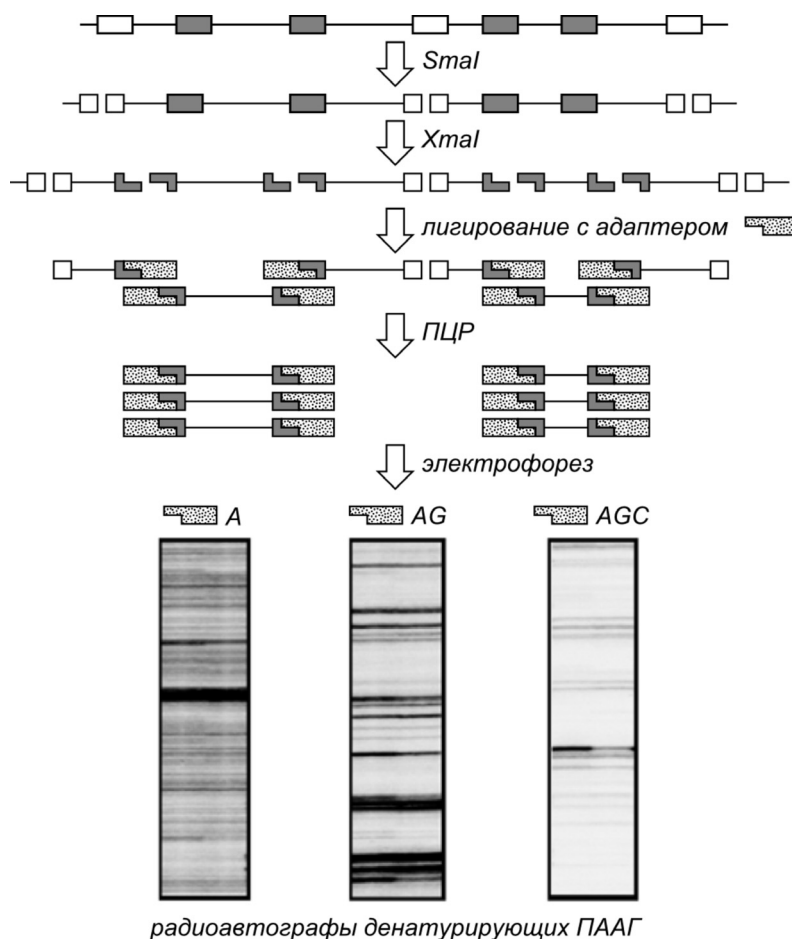


Рис. 1. Схема метода амплификации интерметилированных сайтов. Сплошная линия изображает участок геномной ДНК, содержащий семь сайтов CCCGGG. Неметилированные сайты обозначены белым, метилированные — серым. Радиоавтографы полиакриламидных гелей (ПААГ) иллюстрируют фингерпринты, полученные с использованием праймеров, удлинённых на 1–3 нуклеотида. (По Frigola et al., 2002).

с «тупыми» концами. Метилированные гексануклеотиды CCGGG, оставшиеся интактными, затем расщепляются рестриктазой XmaI (сайт узнавания C/CCGGG), которая формирует фрагменты с «липкими» концами. Такие фрагменты ДНК способны взаимодействовать с адаптерами в реакции лигирования и подвергаться амплификации в последующей ПЦР. Для идентификации метилированных участков генома проводится ПЦР всей совокупности лигированных фрагментов с меченых праймеров, в целом гомологичных адаптеру, но удлиненных на 1–4 случайно выбранных нуклеотида (рис. 1). Использование таких «удлинителей» снижает сложность конечной картины АИМС, позволяя добиться степени разделения продуктов АИМС, оптимальной для анализа.

В модификации метода АИМС, примененной в данной работе, гидролиз ДНК осуществляли по следующей схеме: к 1500 нг геномной ДНК добавляли 3 е.а. фермента SmaI и 1,2 мкл соответствующего 10х буфера, доводили до 20 мкл деионизованной водой и инкубировали 16 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 3 е.а. фермента XmaI и инкубировали 6 ч в термостате при температуре 37°C. Инактивация ферментов рестрикции проводилась при 65°C в течение 20 мин. Затем проводили частичную застройку концов фрагментов, для чего в смесь добавляли 1 мкМ dCTP и 3 е.а. ДНК полимеразы I E.coli (фрагмент Кленова) после чего смесь термостатировали 4 ч при 37°C. Для лигирования адаптеров к фрагментам гидролиза ДНК добавляли 5 е.а. фермента T4 ДНК-лигазы (СибЭнзим, Россия), 2,6 мкл буфера Yellow (СибЭнзим), 2 мкл

адаптеров (15 мкМ) и 1 мкМ dATP, затем смесь инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Далее следовал этап ник-трансляции, для чего в смесь добавляли по 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата и 1 ед. Taq-полимеразы. Конечный объем смеси — 20 мкл. Инкубировали 30 мин при 72°C.

Для проведения последующей ПЦР к 0,1 мкг ДНК из лигированной смеси добавляли по 0,05 мкМ каждого олигопраймера (один из праймеров содержал 5'-концевую флуоресцентную метку), по 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1 ед. Taq-полимеразы, 1,3 мкл формамида и 2,5 мкл десятикратного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,4), 50 мМ MgCl₂, деионизованной воды до 25 мкл конечного объема. Смесь прогревали при 95°C в течение 5 мин, затем проводили 40 циклов ПЦР по следующей программе: денатурация при 95°C — 40 с, отжиг 72°C — 40 с и элонгация при 70°C — 40 с. Для контроля наличия продуктов ПЦР проводили электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра [38].

Высокоразрешающий анализ продуктов ПЦР проводили капиллярным электрофорезом в формате фрагментного анализа на приборе и по протоколам ABI Prism 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Анализ электрофореграмм фрагментного анализа проводили с помощью компьютерной программы PeakPick собственной разработки [40]. Картирование локусов, соответствующих полученным продуктам АИМС, проводили с использованием компьютерной программы AIMS *in silico* [41].

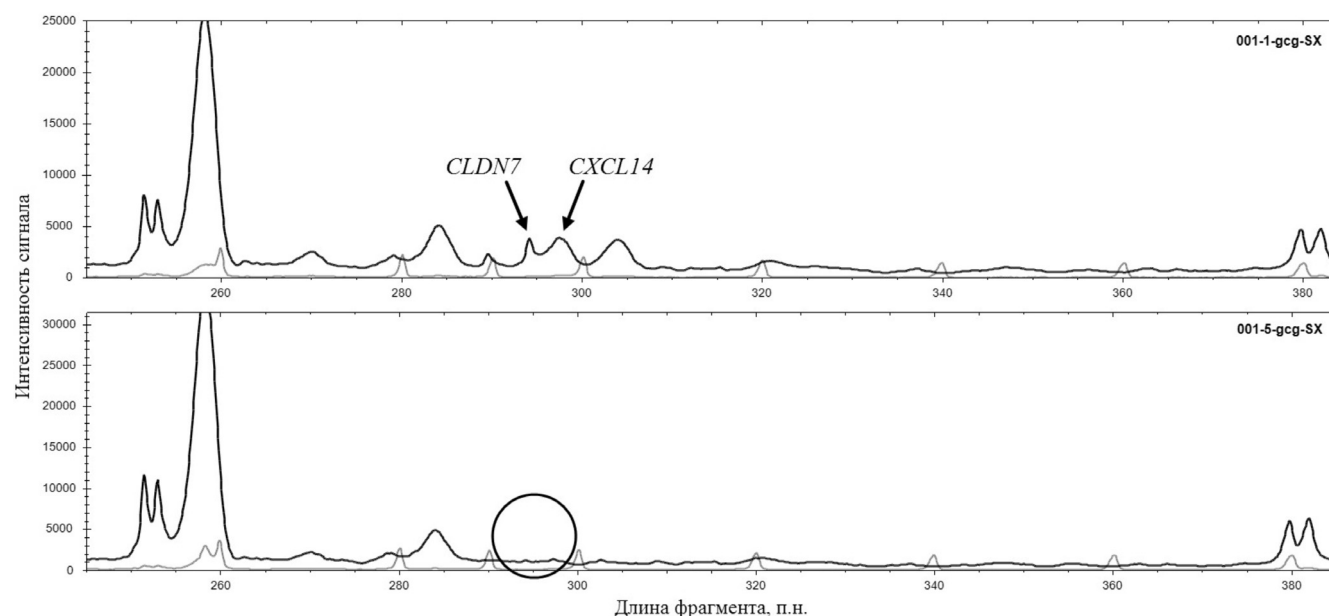


Рис. 2. Аномальное метилирование CpG-островков генов *CLDN7* и *CXCL14* (обозначено стрелками в верхней части рисунка) в ДНК из костного мозга пациента с детским ОМЛ, выявленное на электрофореграмме АИМС. В нижней части рисунка — профиль метилирования ДНК из костного мозга того же пациента после 2-го курса полихимиотерапии; выделенная область демонстрирует отсутствие гиперметилированных локусов.

Результаты и обсуждение

Проблема идентификации генов, вовлечённых в канцерогенез, и характеристика их повреждений — ключевой момент при решении задач онкогеномики. Нарушение функционирования генов, вовлечённых в процессы канцерогенеза, во многом связывают с эпигенетическими аномалиями, к числу которых относятся, в частности, метилирование/деметилирование ДНК генов злокачественных новообразований. Для выявления локусов генома, аномально метилированных при ОМЛ у детей, мы использовали метод амплификации интерметилированных сайтов (АИМС), который позволяет исследовать дифференциальное метилирование ДНК, в том числе опухолевых клеток, на основе адаптер-опосредованной ПЦР.

Скрининг дифференциального метилирования генов позволил в настоящем исследовании выявить 16 локусов, подверженных аномальному метилированию при ОМЛ у детей. Пример электрофореграммы продуктов АИМС, содержащих аномально метилированные фрагменты ДНК, представлен на рис. 2. Определена геномная принадлежность выявленных локусов (таблица). Аномально метилированными считали участки генома, выявляемые в образцах костного мозга и/или крови больных до лечения и отсутствующие после полихимиотерапии. Подтверждение неметилированного состояния этих локусов в норме в гемопоэтических стволовых клетках (CD34+CD38-Lin-) получено из базы данных NGSmethDB (<http://bioinfo2.ugr.es/NGSmethDB>).

Характеристика генов, содержащих выявленные участки генома, получена по данным <http://genome.ucsc.edu>: UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly. Практически все они принадлежат промоторным CpG-островкам генов, за исключением одного, принадлежащего межгенному CpG-островку (7p21.1). Результаты скрининга ожидаемы и не расходятся с общепринятыми представлениями о характере метилирования опухолевых геномов.

Аномальное метилирование всех 15 выявленных CpG-островков генов (*EGFLAM*, *RXRA*, *MAFA*, *TMEM176A/TMEM176B*, *RNF138*, *KHSRP*, *TMEM200B*, *SAMD5*, *ABCG4*, *GSGIL*, *CLDN7*, *CXCL14*, *DLK2*, *AIFM3*, *SOX8*) при детском ОМЛ показано нами впервые. Из перечисленных генов лишь для трёх (*EGFLAM*, *CLDN7*, *CXCL14*) ранее было показано аномальное метилирование при злокачественных новообразованиях [10, 24, 31, 37]. Скрининг дифференциального метилирования проводился непредвзятым методом, поэтому естественно, что выявленные гены имеют разнообразные клеточные функции. Ассоциации с опухолевыми процессами в настоящее время показаны для 11 из 15 генов (табл. 1). Известных генов-супрессоров опухолевого роста среди них не обнаружено.

Белковые продукты двух генов (*RXRA*, *KHSRP*) в последнее время активно исследуются как непосред-

ственные участники процесса лейкогенеза [25, 7, 36, 42, 15].

Считается, что ген *RXRA* является ключевым элементом онкогенного комплекса при остром промиелоцитарном лейкозе. Внутрядерные рецепторы ретиноидов X (RXR) и рецепторы ретиноевой кислоты (RAR) опосредуют биологические эффекты активации генной экспрессии, медиатором которых является ретиноевая кислота. Рецепторы связываются в виде гомо- или гетеродимеров со специфическими последовательностями промоторных областей генов-мишеней и регулируют их транскрипцию. В отсутствие лиганда (ретиноевой кислоты) RXR/RAR гетеродимеры ассоциируют в мультибелковый комплекс, содержащий транскрипционные корепрессоры, которые индуцируют конденсацию хроматина и подавление транскрипции. При появлении лиганда корепрессоры диссоциируют от рецепторов и ассоциируют с коактиваторами, что ведет к активации транскрипции.

Комплекс RARA/RXRA — ингибитор ядерных транскрипционных факторов, приводящий к угнетению экспрессии генов клеточной дифференцировки стромальных элементов костного мозга и приводящий к возникновению острого промиелоцитарного лейкоза. ОПЛ чрезвычайно чувствителен к ретиноевой кислоте и триоксиду мышьяка, которые играют роль триггера для клеточной дифференцировки. В то время как ретиноевая кислота запускает транскрипционную активацию мишеней PML/RARA, механизмы действия триоксида мышьяка остаются неясными. Считается, что это происходит за счёт ослабления связи между белками PML/RARA и RXRA. Белок RXRA содействует эффективному связыванию белка PML/RARA и ДНК. Удаление рецепторов ретиноида X мышьяком ослабляет связывание белка PML/RARA с ДНК, индуцируя тем самым дифференцировку клеток ОПЛ. RXRA, одновременно, направлено способствует PML/RARA-зависимой трансформации *in vivo*, главным образом за счёт усиления ингибирования факторов транскрипции [25]. При этом нужно учитывать, что в нормальном костном мозге по данным <http://www.proteinatlas.org/> наблюдается высокая экспрессия белка RXRA, а по результатам нашего исследования в образцах ОМЛ у детей обнаруживается гиперметилирование промоторного CpG-островка гена *RXRA*, что указывает на возможное нарушение нормальных процессов активации/деактивации транскрипции комплексом RARA/RXRA.

В настоящее время не описано участие гена *RXRA* в возникновении других морфологических подтипов ОМЛ, также отсутствуют данные по метилированию *RXRA* при ОМЛ у детей. Метилирование гена *RXRA* было показано при исследованиях немелкоклеточного рака лёгких, однако корреляции с экспрессии мРНК в исследовании обнаружено не было [30].

**Характеристика генов, содержащих аномально метилированные локусы,
выявленные в настоящем исследовании при ОМЛ у детей
методом непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов**

Название гена, локализация	Функция белкового продукта и/или доменная структура	Ассоциированные опухоли
<i>EGFLAM</i> , 5p13.2	Домены EGF-подобные, фибронектина типа III, ламинина G.	Гипометилирование ДНК при эпителиальном раке яичников по сравнению с доброкачественными заболеваниями яичников [24].
<i>RXRA</i> , 9q34.2	Рецептор ретиноидов X, альфа — ядерный рецептор, вовлеченный в посттрансляционную модификацию гистонов.	Потеря гетерозиготности при карциноме щитовидной железы [21]. <i>Ключевой элемент онкогенного комплекса при остром промиелоцитарном лейкозе, в настоящее время известен опосредованный механизм через взаимодействие с химерным белком PML/RARA, возникающим при транслокации t(15;17)(q24;q21) [15, 25].</i>
<i>MAFA</i> , 8q24.3	Транскрипционный фактор, регулирующий тканеспецифичную экспрессию гена инсулина в β -клетках поджелудочной железы	Инсулинома — снижение уровня экспрессии белка MAFA [26], колоректальный рак — гиперэкспрессия белка MAFA [45].
<i>TMEM176A/TMEM176B</i> , 7q36.1	TMEM 176A — трансмембранный белок 176A, антиген 112, ассоциированный с гепатоцеллюлярной карциномой. TMEM 176B — трансмембранный белок 176B.	Гиперэкспрессия белков 176A и 176B — лимфома, карцинома лёгких [13].
<i>RNF138</i> , 18q12.1	Элемент белкового комплекса, реализующего разнообразные взаимодействия типа белок-ДНК, белок-белок.	Глиома — гиперэкспрессия мРНК [49], колоректальный рак — снижение экспрессии мРНК [20].
<i>KHSRP</i> , 19p13.3	РНК-связывающий белок KHSRP/KSRP, тропный к аденин/урацил-богатым последовательностям и регулирующий посттранскрипционную стабильность мРНК.	Почечно-клеточная карцинома химерный ген KHSRP-TFE3 [32], глиобластома — подтверждено участие продукта гена в генезе заболевания [47]. <i>Участие в лейкемогенезе в настоящее время не показано. Обсуждается участие в регуляции гемопоэза [7].</i>
<i>TMEM200B</i> , 1p35.3	Трансмембранный белок	Не показано
<i>SAMD5</i> , 6q24.3	Недостаточно сведений	Не показано
<i>ABCG4</i> , 11q23.3	Входит в суперсемейство АТФ-связывающих (ABC) переносчиков. ABC белки транспортируют различные молекулы через вне- и внутриклеточных мембраны.	Не показано
<i>GSG1L</i> , 16p12.1	Ионотропный рецептор глутамата, передаёт быстрые возбуждающие сигналы в синапсах нервной системы позвоночных.	Не показано
<i>CLDN7</i> , 17p13.1	Член семейства Claudin: интегральные мембранные белки и элементы нитей запирающей зоны. Нити запирающей зоны служат в качестве физического барьера для транспорта веществ по межклеточному пространству, а также играют важную роль в поддержании клеточной полярности.	Рак молочной железы — снижение экспрессии белка CLDN7 [37], рак яичников — гиперэкспрессия мРНК [14].
<i>CXCL14</i> , 5q31.1	Принадлежит к семейству цитокинов, участвующих в иммунорегуляторных и воспалительных процессах.	Гиперэкспрессия мРНК при раке простаты [43], гиперметилирование, снижение экспрессии мРНК и белка при колоректальной карциноме [10, 31], гиперметилирование промоторной области в интестинальных нейроэндокринных опухолях, снижение экспрессии мРНК в метастатических опухолях по сравнению с первичными новообразованиями [18].
<i>DLK2</i> , 6p21.1	Модулятор адипогенеза.	Лентовидноклеточный рак простаты — мутации с нарушением структуры белка [29], меланома — снижение экспрессии белка DLK2 [34].
<i>AIFM3</i> , 22q11.21	Фактор, индуцирующий апоптоз, ассоциированный с митохондриями.	Гепатома — подавление экспрессии через miP-210 [46].
— 7p21.1	Межгенный CpG-островок	Нет данных.
<i>SOX8</i> , 16p13.3	Белок семейства SOX — транскрипционных факторов, участвующих в регуляции эмбрионального развития.	Рак лёгких — снижение экспрессии белка SOX8 [44], гепатоцеллюлярная карцинома — гиперэкспрессия мРНК [48], опухоли головного мозга — экспрессия мРНК, отсутствующая в норме [11].

Ген *KHSRP* кодирует белок KHSRP/KSRP, связывающий аденин/урацил-богатые последовательности мРНК. АУ-богатые последовательности обнаружены в 3'-нетранслируемых областях многих мРНК, кодирующих регуляторы клеточного роста и выживаемости, такие как цитокины и белки-супрессоры опухолевого роста. Стабилизация мРНК белками, связывающимися с АУ-богатыми последовательностями, играет важную роль в спектре посттрансляционных механизмов генной регуляции роста, дифференцировки и малигнизации гемопоэтических стволовых клеток, наряду с микроРНК как регуляторами стабильности мРНК [7]. Высокая экспрессия KSRP была обнаружена в фазе бластного криза хронического миелоидного лейкоза по сравнению с хронической фазой заболевания [36].

Для использования в диагностике МОБ при детском ОМЛ сформирована система маркёров метилирования, в которую включено 13 из 16 дифференциально метилированных локусов, выявленных в исследовании. Принципы включения локуса в систему маркёров: высокая частота метилирования в образцах до лечения (>25%), чёткое разрешение фрагмента на электрофореграмме. Таким образом, локусы, принадлежащие генам *SAMD5* и *RNF138*, не участвуют в формировании системы, так как их близкое расположение на электрофореграмме не дает достаточной информативности для анализа наличия пика локуса и определения его высоты. Локус, принадлежащий межгенному CpG-островку, показал низкий процент метилирования в образцах до лечения, поэтому также исключен из системы диагностических маркёров.

Выбранный набор локусов является в исследованной выборке достаточным для однозначной идентификации опухолевого процесса и, следовательно, потенциально применим для определения МОБ. Ответ на вопрос о возможности молекулярной классификации ОМЛ на базе выявленных аномально метилированных элементов генома возможен при дальнейшем увеличении объёмов выборки.

Список литературы

1. Землякова В.В., Стрельников В.В., Зборовская И.Б., Балкова О.В., Майорова О.А., Васильев Е.В., Залетаев Д.В., Немцова М.В. Сравнительный анализ аномального метилирования CpG-островков, расположенных в промоторных областях генов *p16/CDKN2A* и *p14/ARF*, при немелкоклеточном раке лёгкого и остром лимфобластном лейкозе // Молекулярная биология. — 2004. — 38(6). — С. 966—972.
2. Agrawal S., Unterberg M., Koschmieder S. et al. DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia // *Cancer Res.* — 2007. — Feb 1. — Vol. 67(3). — P. 1370—1377.
3. Alvarez S., Suela J., Valencia A., Fernandez A., Wunderlich M. et al. DNA Methylation Profiles and Their Relationship with Cytogenetic Status in Adult Acute Myeloid Leukemia // *PLoS ONE.* — 2010. — 5(8). — e12197.
4. Babenko O.V., Zemlyakova V.V., Saakyan S.V., Brovkin A.F., Strel'nikov V.V., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. RB1 and CDKN2A functional defects resulting in retinoblastoma // *Molecular Biology.* — 2002. — Vol. 36(5). — P. 625—630.
5. Baer M.R., Stewart C.C., Dodge R.K. et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implication for residual disease detection // *Blood.* — 2001. — Vol. 97. — P. 3574—3580.
6. Balgobind B.V., Hollink I., Arentsen-Peters S., Zimmermann M., Harbott J. et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia // *Haematologica.* — 2011. — 10(96). — P. 1478—1487.
7. Baou M., Norton J.D., Murphy J.J. AU-rich RNA binding proteins in hematopoiesis and leukemogenesis // *Blood.* — 2011. — Nov 24. — Vol. 118(22). — P. 5732—5740.
8. Campana D., Pui C.-H. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Methodologic Advances and Clinical Significance // *Blood.* — 1995. — Vol. 85, №6 (March 15). — P. 1416—1434.
9. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* — 2010. — P. 7—12.
10. Cao B., Yang Y., Pan Y., Jia Y., Brock M.V., Herman J.G., Guo M. Epigenetic silencing of CXCL14 induced colorectal cancer migration and invasion // *Discov. Med.* — 2013. — Oct. — Vol. 16(88). — P. 137—147.
11. Cheng Y.C., Lee C.J., Badge R.M., Orme A.T., Scotting P.J. Sox8 gene expression identifies immature glial cells in developing cerebellum and cerebellar tumours // *Brain Res. Mol. Brain Res.* — 2001. — Aug 15. — Vol. 92(1—2). — P. 193—200.
12. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Rubnitz J.E. et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukemia // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 123. — P. 243—252.
13. Cuajungco M.P., Podevin W., Valluri V.K., Bui Q., Nguyen V.H., Taylor K. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology // *Acta Histochem.* — 2012. — Nov. — Vol. 114(7). — P. 705—712.
14. Dahiya N., Becker K.G., Wood W.H. 3rd, Zhang Y., Morin P.J. Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion // *PLoS One.* — 2011. — P. 6(7).
15. De Braekeleer E., Douet-Guilbert N., De Braekeleer M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review // *Expert Rev. Hematol.* — 2014. — Jun. — 7(3). — P. 347—357.
16. Ekmekci C.G., Gutierrez M.I., Siraj A.K. et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia // *Am. J. Hematol.* — 2004. — Vol. 77. — P. 233—240.
17. Figueroa Maria E., Sanne Lugthart, Yushan Li, Claudia Erpelinck-Verschueren, Xutao Deng, Paul J. Christos, Elizabeth Schifano et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia // *Cancer cell.* — 2010. — Vol. 17, №1. — P. 13—27.
18. Fotouhi O., Adel Fahmideh M., Kjellman M. et al. Global hypomethylation and promoter methylation in small intestinal neuroendocrine tumors: an in vivo and in vitro study // *Epigenetics.* — 2014. — Jul. — 9(7). — P. 987—997.
19. Frigola J., Ribas M., Risques R.A., Peinado M.A. Methylation profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS) // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Apr 1. — 30(7). — e28.
20. Fu J., Tang W., Du P., Wang G., Chen W., Li J., Zhu Y., Gao J., Cui L. Identifying microRNA-mRNA regulatory network in colorectal cancer by a combination of expression profile and bioinformatics analysis // *BMC Syst. Biol.* — 2012. — Jun 15. — 6. — P. 68.

21. Gauchotte G., Lacomme S., Brochin L., Tournier B., Cahn V., Monhoven N., Piard F., Klein M., Martinet N., Rochette-Egly C., Vignaud J.M. Retinoid acid receptor expression is helpful to distinguish between adenoma and well-differentiated carcinoma in the thyroid // *Virchows Arch.* — 2013. — Jun. — Vol. 462(6). — P. 619–632.
22. Grimwade D., Jovanovic J.V., Hills R.K. et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct preemptive arsenic trioxide therapy // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27. — P. 3650–3658.
23. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials // *Blood.* — 2010. — Vol. 116. — P. 354–365.
24. Gu X.H., Lu Y., Ma D., Liu X.S., Guo S.W. Model of aberrant DNA methylation patterns and its applications in epithelial ovarian cancer // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* — 2009. — Oct. — Vol. 44 (10). — P. 754–759.
25. Halftermeyer J., Le Bras M., De The H. RXR, a key member of the oncogenic complex in acute promyelocytic leukemia // *Med. Sci. (Paris).* — 2011. — Nov. — Vol. 27 (11). — P. 973–978.
26. Hamze Z., Vercherat C., Bernigaud-Lacheretz A., Bazzi W., Bonnavion R., Lu J., Calender A., Pouponnot C., Bertolino P., Roche C., Stein R., Scoazec J.Y., Zhang C.X., Cordier-Bussat M. Altered MENIN expression disrupts the MAFA differentiation pathway in insulinoma // *Endocr. Relat. Cancer.* — 2013. — Oct 24. — Vol. 20(6). — P. 833–848.
27. Kelly L.M., Gilliland D.G. Genetics of myeloid leukemias // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* — 2002. — 3. — P. 179–198.
28. Kern W., Danhauser-Riedl S., Ratei R. et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow // *Haematologica.* — 2003. — Vol. 88. — P. 646–653.
29. Kumar A., White T.A., MacKenzie A.P. et al. Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — Oct 11. — Vol. 108(41). — P. 17087–17092.
30. Lee S.M., Lee J.Y., Choi J.E., Lee S.Y., Park J.Y., Kim D.S. Epigenetic inactivation of retinoid X receptor genes in non-small cell lung cancer and the relationship with clinicopathologic features // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 2010. — Feb. — Vol. 197(1). — P. 39–45.
31. Lin K., Zou R., Lin F., Zheng S. et al. Expression and effect of CXCL14 in colorectal carcinoma // *Mol. Med. Rep.* — 2014. — Sep. — 10(3). — P. 1561–1568.
32. Malouf G.G., Su X., Yao H. et al. Next-generation sequencing of translocation renal cell carcinoma reveals novel RNA splicing partners and frequent mutations of chromatin-remodeling genes // *Clin. Cancer Res.* — 2014. — Aug 1. — Vol. 20(15). — P. 4129–4140.
33. Matsushita C., Yang Y., Takeuchi S. et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia // *Oncol. Rep.* — 2004. — 12. — P. 97–99.
34. Nueda M.L., Naranjo A.I., Baladron V., Laborda J. The proteins DLK1 and DLK2 modulate NOTCH1-dependent proliferation and oncogenic potential of human SK-MEL-2 melanoma cells // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2014. — Nov. — Vol. 1843(11). — P. 2674–2684.
35. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* — 2012. — P. 35–42.
36. Radich J.P., Dai H., Mao M. et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — Vol. 103(8). — P. 2794–2799.
37. Ricardo S., Gerhard R., Cameselle-Teijeiro J.F., Schmitt F., Paredes J. Claudin expression in breast cancer: high or low, what to expect? // *Histol. Histopathol.* — 2012. — Oct. — Vol. 27(10). — P. 1283–1295.
38. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual.* — 1989.
39. Schnittger S., Kern W., Tschulik C. et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 // *Blood.* — 2009. — Sep 10. — Vol. 114(11). — P. 2220–2231.
40. Tanas A.S., Shkarupo V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening // *Epigenomics.* — 2010. — 2(2). — P. 325–333.
41. Tanas A.S., Shkarupo V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Amplification of intermethylated sites experimental design and results analysis with AIMS in silico computer software // *Molecular biology.* — 2010. — Vol. 44(2). — P. 317–325.
42. Vitaliano-Prunier A., Halftermeyer J., Ablain J., de Reynies A., Peres L., Le Bras M., Metzger D., de The H. Clearance of PML/RARA-bound promoters suffice to initiate APL differentiation // *Blood.* — 2014. — Dec 11. — Vol. 124(25). — P. 3772–3780.
43. Williams K.A., Lee M., Hu Y. et al. A systems genetics approach identifies CXCL14, ITGAX, and LPCAT2 as novel aggressive prostate cancer susceptibility genes // *PLoS Genet.* — 2014. — Nov 20. — P. 10(11).
44. Xie C., Han Y., Liu Y., Han L., Liu J. miRNA-124 down-regulates SOX8 expression and suppresses cell proliferation in non-small cell lung cancer // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* — 2014. — Oct 15. — 7(11). — P. 7518–7526.
45. Xu Y.Y., Jin H.Y., Tan X.Z., Liu X.F., Ding Y.J. et al. Tea polyphenol inhibits colorectal cancer with microsatellite instability by regulating the expressions of HES1, JAG1, MT2A and MAFA // *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* — 2010. — Sep. — 8 (9). — P. 870–876.
46. Yang W., Sun T., Cao J., Liu F., Tian Y., Zhu W. Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro. *Exp Cell Res.* 2012. — May 1. — Vol. 318(8). — P. 944–954.
47. Yang J., Fan J., Li Y., Li F., Chen P., Fan Y., Xia X., Wong ST. Genome-wide RNAi screening identifies genes inhibiting the migration of glioblastoma cells. *PLoS One.* Apr 12; 2013. — 8(4). — e61915.
48. Zhang S., Zhu C., Zhu L., Liu H., Liu S., Zhao N., Wu J., Huang X., Zhang Y., Jin J., Ji T., Ding X. Oncogenicity of the transcription factor SOX8 in hepatocellular carcinoma // *Med. Oncol.* — 2014. — Apr. — Vol. 31(4). — P. 918.
49. Zhou Y.X., Chen S.S., Wu T.F. et al. A novel gene RNF138 expressed in human gliomas and its function in the glioma cell line U251 // *Anal. Cell. Pathol. (Amst.).* — 2012. — Vol. 35 (3). — P. 167–178.

Novel markers of aberrant DNA methylation in pediatric acute myeloid leukemia identified by unbiased screening of differential methylation

Rudenko V.V.^{1,2}, Nemirovchenko V.S.³, Tanas A.S.^{1,2,4}, Popa A.V.³, Kazakova S.A.¹, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Zaletaev D.V.^{1,2,4}, Strelnikov V.V.^{1,2,4}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechye St, 1, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: tanas80@gmail.com

³ — N.N. Blokin Russian Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation, 115478, Kashirskoe highway, 24, e-mail: apopa@list.ru

⁴ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St, 1, e-mail: zalnem@mail.ru

By use of the unbiased differential DNA methylation screening we have identified 16 novel genome loci aberrantly methylated in pediatric acute myeloid leukemia. Almost all of them belong to promoter CpG islands except one corresponding to the intergenic CpG island on the chromosome 7p21.1. Two of the genes shown to be abnormally methylated in our study encode proteins involved in the epigenetic regulation of gene expression, namely, RXRA, involved in the posttranslational histone modifications, and KHSRP/KSRP, that binds to adenine/uracil rich RNA sequences and regulates posttranscriptional RNA stability. We suggest a system of 13 DNA methylation markers, corresponding to the promoter regions of the *EGFLAM*, *RXRA*, *MAFA*, *TMEM176A/TMEM176B*, *KHSRP*, *TMEM200B*, *ABCG4*, *GSG1L*, *CLDN7*, *CXCL14*, *DLK2*, *AIFM3* and *SOX8* genes, for the detection of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia.

Key words: pediatric acute myeloid leukemia, minimal residual disease, DNA differential methylation, amplification of intermethylated sites, unbiased differential methylation screening