

ИЗУЧЕНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ РОЛИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ-ОНКОСУПРЕССОРОВ В СПОРАДИЧЕСКИХ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Трифанов В.С.¹, Колесников Е.Н.¹, Гвалдин Д.Ю.¹, Петрусенко Н.А.¹, Потемкин Д.С.¹, Мещерякова М.Ю.¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии», Ростов-на-Дону, e-mail: trifan1975@yandex.ru

Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы можно назвать самой изученной группой нейроэндокринных неоплазий, однако исследования, направленные на изучение эпигенетических процессов в НЭО, немногочисленны. Тем не менее aberrантное метилирование ДНК играет важную роль в канцерогенезе НЭО ПЖ и предопределяет гетерогенность клинической картины заболевания и его прогноз. Изучение эпигенетических особенностей sporadic и наследственных НЭО ПЖ позволило выявить различные паттерны метилирования ДНК в каждой из групп. Имеющиеся на сегодняшний день данные говорят о том, что функционально активные и функционально неактивные НЭО также характеризуются различным метилаторным фенотипом. Однако исследований, направленных на изучение прогностической роли метилирования генов в нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы, не проводилось. В данной статье представлены результаты изучения статуса метилирования 8 генов-онкосупрессоров AHRH, APC1A, DAPK, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A, RUNX3 и ретротранспозона LINE1 методом пиросеквенирования в sporadic высокодифференцированных нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы. Сопоставление клинических наблюдений с данными об эпигенетическом статусе генома позволило сделать выводы о прогностической роли метилирования выбранных генов. Использование статуса метилирования генов-онкосупрессоров с прогностической целью мы считаем наиболее современным подходом к выбору тактики ведения пациентов и считаем, что данная проблема нуждается в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: нейроэндокринные опухоли, эпигенетика, паттерны метилирования, прогноз.

STUDING THE PROGNOSTIC ROLE OF ONCOSUPPRESSOR GENE METHYLATION IN SPORADIC HIGHLY DIFFERENTIATED NEUROENDOCRINE PANCREATIC TUMORS

Trifanov V.S.¹, Kolesnikov E.N.¹, Gvaldin D.Yu.¹, Petrusenko N.A.¹, Potemkin D.S.¹, Mesheryakova M.Y.¹

¹FGBU "National Medical Research Centre for Oncology", Rostov-on-Don, e-mail: trifan1975@yandex.ru

Neuroendocrine tumors of the pancreas can be called the most studied group of neuroendocrine neoplasias, but studies aimed at studying epigenetic processes in the NEO are few. Nevertheless, aberrant DNA methylation plays an important role in the carcinogenesis of pancreatic neoand determines the heterogeneity of the clinical picture of the disease and its prognosis. The study of the epigenetic features of sporadic and hereditary NEOS of the pancreas revealed different patterns of DNA methylation in each of the groups. The available data suggest that functionally active and functionally inactive NEOS are also characterized by different methylatory phenotypes. However, studies aimed at studying the prognostic role of gene methylation in neuroendocrine pancreatic tumors have not been conducted. This article presents the results of the study of the methylation status of 8 oncosuppressor genes AHRH, APC1A, DAPK, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A, RUNX3 and retrotransposon LINE1 by pyrosequencing in sporadic highly differentiated neuroendocrine tumors of the pancreas. Comparison of clinical observations with data on the epigenetic status of the genome allowed us to draw conclusions about the prognostic role of methylation of the selected genes. We consider the use of the methylation status of oncosuppressor genes for prognostic purposes to be the most modern approach to the choice of patient management tactics and believe that this problem needs further study.

Keywords: neuroendocrine tumors, epigenetics, methylation patterns, prognosis.

Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (НЭО ПЖ) можно назвать самой изученной группой нейроэндокринных неоплазий, однако исследования, направленные на

изучение эпигенетических процессов в НЭО, немногочисленны. Тем не менее в последнее время все больше появляется данных, подтверждающих роль эпигенетических изменений генома в канцерогенезе злокачественных опухолей, не уступающих по своей значимости структурным перестройкам ДНК вследствие мутаций [1].

Несмотря на то что НЭО ПЖ считаются новообразованиями с низким злокачественным потенциалом, не в каждом случае следует ожидать благоприятного клинического течения заболевания, что составляет особую дилемму в планировании объема оперативного вмешательства [2]. В настоящее время достоверно известно, что такой эпигенетический механизм, как ремоделирование хроматина, регулируется белками генов ATRX и DAXX, взаимоисключающие мутации в которых приводят к активации пути альтернативного удлинения теломер и дестабилизации генома, что в свою очередь ассоциировано с высокими рисками метастазирования и ухудшением показателей выживаемости [3]. Данные эпигенетические и генетические события в гормонально неактивных НЭО ПЖ до 2 см являются прямым показанием к выполнению радикальной операции. Тем не менее сведения о прогностической роли метилирования других генетических локусов отсутствуют [4].

Позитивный статус метилирования CpG-островков (CIMP) был обнаружен в 20% изученных НЭН поджелудочной железы и других гастроинтестинальных НЭН, и в каждом случае был ассоциирован с низкой степенью дифференцировки опухоли (Ki67 >10%), тогда как негативный статус CIMP коррелировал с увеличением общей продолжительности жизни пациентов [5]. Кроме того, метилирование трех и более локусов генов-кандидатов коррелировало с высоким риском раннего рецидива и неблагоприятным прогнозом исхода заболевания [6]. Tirosh A. et al. обнаружили большое количество гиперметилированных генов НЭО ПЖ, регулирующих процессы репарации ДНК, транскрипции и трансляции, синтеза белка, а также ремоделирование хроматина и стабилизацию теломер [7]. Метилирование ДНК ранее было описано для следующих генов: VHL, p16, RASSF1, DAPK1, TIMP3, PAX5, NIC1, CADM1, PUCARD, ESR1, VHL, RARB, WT1 MGMT [1].

Сравнительный анализ метиляторных профилей DAXX/ATRX-позитивных и DAXX/ATRX-негативных НЭО ПЖ позволил выявить некоторые различия, что является косвенным доказательством того, что потеря экспрессии гена DAXX активирует эпигенетические модификации ДНК. В НЭО ПЖ с отсутствием экспрессии генов DAXX/ATRX выражено глобальное гипометилирование [8]. Следовательно, для НЭО ПЖ с хромосомной нестабильностью характерно гипометилирование ретротранспозона LINE1 [5].

Метилирование промоторного региона гена CDKN2A часто встречается в злокачественных новообразованиях и характерно для рака молочной железы (33%),

предстательной железы (60%) и колоректального рака (92%) [8]. Метилирование CDKN2A/P16 выявляется в 40% НЭО ПЖ и связано с неблагоприятным прогнозом [9]. Гиперметилирование промоторного региона CDKN2A/P16 было обнаружено в 52-62,5% гастрином и в 17% инсулином, причем ассоциации данного эпигенетического события со стадией заболевания, локализацией первичной опухоли и прогнозом выявлено не было [10].

В функционально неактивных НЭО ПЖ в 75% случаев гиперметилирован промоторный регион гена-онкосупрессора RASSF1A [11]. По данным Malpeli et al., эпигенетические модификации гена RASSF1A чаще встречаются именно в метастатических опухолях (100%) по сравнению с первичными поражениями (71%) [12].

Метилирование гена MGMT характерно для 40% НЭО ПЖ и может быть использовано в качестве предиктивного маркера ответа на терапию темозоломидом [13].

Lakis et al. выделили несколько подгрупп НЭО ПЖ на основании изучения профилей метилирования ДНК. Первую подгруппу опухолей, которую составили преимущественно функционально активные НЭО ПЖ, характеризовал дикий тип генов ATRX, DAXX и MEN1 и гетерогенные паттерны вариаций копий числа генов. Во второй подгруппе НЭО ПЖ мутации генов ATRX/DAXX/MEN1 сочетались с потерей гетерозиготности в 11 хромосоме, причем данные события коррелировали с худшими показателями общей выживаемости. В третью подгруппу были включены НЭО ПЖ с мутацией MEN1, диким типом ATRX/DAXX и отсутствием значимых вариаций копий числа генов, не считая потери гетерозиготности в хромосоме 11. Среди опухолей третьей группы преобладали высокодифференцированные формы НЭО ПЖ, в которых перинеуральная и лимфоваскулярная инвазии не встречались [13].

Tirosh et al. в 2019 году опубликовали результаты проведенного полногеномного исследования паттернов метилирования нефункционирующих спорадических и наследственных НЭО ПЖ (НФ-НЭО ПЖ). В спорадических и наследственных НФ-НЭО ПЖ с мутацией гена MEN1 были метилированы гены, регулирующие секрецию инсулина, а в опухолях с мутацией VHL – гены, регулирующие процесс β -клеточной дифференцировки. Оба транскрипционных фактора, RUNX1 и RUNX3, были гиперметилированы в спорадических и наследственных НФ-НЭО ПЖ с мутацией VHL. Авторы описали эпигенетические альтерации генов, регулирующих работу mTOR-сигнального пути. Кроме того, в спорадических НФ-НЭО ПЖ было зафиксировано метилирование гена SFRP5, ассоциированного с Wnt/ β -catenin сигнальным путем. Метилирование промоторных регионов CDCA7L и RBM47 идентифицировали в НФ-НЭО ПЖ с мутацией гена MEN1. Статус гипометилирования PTPRN2 был установлен во всех образцах спорадических и наследственных НФ-НЭО ПЖ.

Изучение эпигенетических особенностей спорадических и наследственных НЭО ПЖ позволило выявить различные паттерны метилирования ДНК в каждой из групп. Спорадические и наследственные НЭО ПЖ с мутацией *MEN1* характеризуются равным количеством метилированных генетических локусов. В НЭО ПЖ с наследственной мутацией гена *VHL* преобладают явления гипометилирования [9]. Обращает на себя внимание то, что между НЭО ПЖ со спорадическими и герминальными мутациями гена *MEN1* различий метилаторного фенотипа установлено не было. По данным Tirosh A. et al., во всех случаях НЭО ПЖ с мутацией *MEN1* ген *APC* гиперметилирован в 12 локусах, локализованных в промоторном регионе 1A *APC*. Большинство из этих опухолей (12/13) были метастатическими [7].

До 40% генома человека представлено мобильными элементами, и 17% из этого количества составляет ретротранспозон *LINE-1*, обладающий автономностью в связи со способностью к кодированию некоторых ферментов, необходимых для собственного перемещения в пределах ДНК. Мобильная активность ретротранспозонов, как правило, сопряжена с инсерционным мутагенезом, различными повреждениями ДНК и хромосомной нестабильностью, что вносит определенный вклад в канцерогенез. Ретротранспозон *LINE-1* в большинстве клеток организма находится в неактивном состоянии за счет гиперметилирования, что снижает его экспрессию. Аберрантные эпигенетические модификации ретротранспозона *LINE-1* обычно указывают на глобальные генетические аномалии в геноме. Глобальное гипометилирование – один из ключевых факторов развития опухоли, связанных с усилением процессов транскрипции [1].

Таким образом, аберрантное метилирование ДНК играет важную роль в канцерогенезе НЭО ПЖ и предопределяет гетерогенность клинической картины заболевания и его прогноз.

Целью нашего исследования являлось изучение прогностической роли статуса метилирования 8 генов-онкосупрессоров *AHRR*, *APC1A*, *DAPK*, *MGMT*, *MLH1*, *P16*, *RASSF1A*, *RUNX3* и ретротранспозона *LINE1* в спорадических высокодифференцированных НЭО ПЖ.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе НМИЦ онкологии города Ростов-на-Дону в период с 2011 по 2021 год. Выборку составили 111 пациентов (68 женщин и 43 мужчин), прооперированных по поводу НЭО ПЖ. Критерием включения в исследование являлся диагноз спорадической высокодифференцированной НЭО ПЖ, верифицированный на основании как гистологического исследования, так и иммуногистохимического анализа операционного материала. Из включенных в исследование образцов НЭО ПЖ 64,9%

составили функционально неактивные опухоли и, соответственно, 35,1% - функционально активные, из них 18% было представлено инсулиномами, 2,7% - соматостатиномами, 13,5% глюкагономами, 0,9% виптомами.

На основании анализа базы данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) были отобраны восемь генов-онкосупрессоров, значимых для канцерогенеза опухолей желудочно-кишечного тракта. Уровень глобального метилирования генома был оценен на основании статуса мобильного элемента ретротранспозона LINE1.

Исследование включало этапы выделения ДНК из опухолевой ткани с последующей обработкой ДНК в процессе бисульфитного конвертирования и амплификацией анализируемых генетических локусов. После очистки полученных ампликонов ставили реакцию пиросеквенирования. Полученные результаты обрабатывали с помощью статистических методов. Пороговым значением метилирования (Met) считали показатель 10%, при этом статус гипометилирования был установлен нами в каждом случае при значении показателя Met менее 10% и, соответственно, гиперметилирования – в каждом случае значения Met более 10%.

Результаты исследования и их обсуждение. Было проведено пиросеквенирование ретротранспозона LINE1, результаты которого подтвердили его гипометилирование в 82,8% случаев, что явилось косвенным отражением выраженности глобального метилирования генома в изученных образцах НЭО ПЖ. При этом гипометилирование ретротранспозона LINE1 не коррелировало со степенью дифференцировки опухоли, потенциалом ее злокачественности, полом, отягощенностью семейного анамнеза, а также с возрастом пациентов. Последнее не соответствует результатам ранних исследований, в которых была доказана положительная связь между выраженностью глобального гипометилирования и старением организма. Гипометилирование ретротранспозона LINE1 в абсолютном большинстве образцов НЭО ПЖ указывает на нестабильность генома и повышенную склонность к мутагенным событиям в опухолевых клетках, являющихся неотъемлемой частью прогрессии злокачественного новообразования.

Промоторный регион гена RASSF1A оказался гиперметилирован в абсолютном большинстве проанализированных случаев НЭО ПЖ (100%). При этом мы не наблюдали ассоциации с эпигенетическими изменениями статуса гена RASSF1A и наличием мутации MEN1. Из литературных источников известно, что гиперметилирование RASSF1A чаще встречается в НЭО ПЖ с клинической картиной наследственного синдрома множественной нейроэндокринной неоплазии 1 типа. Так как 100% образцов нашей выборки являлись спорадическими опухолями, то отсутствие указанной связи может косвенно подтверждать

различия в паттернах метилирования наследственных и спорадических НЭО ПЖ, что неоднократно упоминается авторами недавних исследований [6].

В 79% случаев НЭО ПЖ было зафиксировано гиперметилирование гена APC. Наши результаты коррелируют с данными авторов, в исследовании которых ген APC оказался гиперметилирован во всех случаях наличия герминальной мутации гена MEN1. При этом 12 из 13 соответствующих НЭО ПЖ являлись метастатическими. Ранее считалось, что мутация гена APC не участвует в канцерогенезе НЭО ПЖ. Первое описание роли эпигенетических модификаций данного гена Tirosh et al. можно считать революционным. В нашем исследовании мы обнаружили выраженную корреляционную связь между уровнем метилирования гена APC и рисками метастазирования: при значении Met>11% такой риск оказался наиболее высоким [6].

Наряду с генами APC и RASSF1A, наибольшие степени метилирования были установлены в генах RUNX3, MGMT. Относительно редко было обнаружено значение Met>10% генов DAPK, MLH1, AHRR. Прогностическую роль гиперметилирования гена AHRR описали для многих злокачественных новообразований. В нашем исследовании мы подтвердили связь гиперметилирования гена AHRR с лучшим прогнозом для НЭО ПЖ. В одном случае был определен уровень Met=15% для P16. В тех случаях, когда показатель Met незначительно превышал 10% (например, ген MLH1 со значением Met=11 и P16 со значением Met=15%), корреляционная связь между статусом метилирования и микросателлитной нестабильностью не выявлялась.

В 65,6% проанализированных нами образцов НЭО ПЖ была установлена высокая степень метилирования (Met>10%) сразу для двух генов-онкосупрессоров, включенных в нашу панель для исследования.

Характеризуя высокодифференцированные НЭО ПЖ как гормонально активные и неактивные образования, справедливо было бы предположить, что паттерны метилирования внутри данных подгрупп могут иметь некоторые различия. Мы обнаружили, что большинство гормонально активных НЭО ПЖ демонстрируют глобальное гиперметилирование генома и гипометилирование гена RASSF1A. Соответственно, в гормонально неактивных НЭО ПЖ были более выражены глобальное гипометилирование и высокая степень метилирования RASSF1A и APC1A. Кроме того, в 100% изученных образцов гормонально активных НЭО ПЖ метилирование промоторного региона гена MLH1 во много раз превосходило пороговое значение в 10%. В нефункционирующих опухолях данное эпигенетическое событие было зафиксировано в 0% случаев.

Полученные в ходе нашего исследования результаты в совокупности с анализом клинических данных позволили сделать некоторые заключения о прогностическом значении

статуса метилирования генов-онкосупрессоров. Благоприятное клиническое течение с низкими рисками метастазирования наблюдали в случаях НЭО ПЖ со следующими показателями: $Met_{LINE1} > 72\%$, $Met_{APC1} < 11\%$, $Met_{MGMT} < 10,5\%$, $Met_{RASSF1A} < 12\%$ и $Met_{RUNX3} < 10\%$. Напротив, при значениях $Met_{LINE1} < 72\%$, $Met_{APC1} > 11\%$, $Met_{MGMT} > 10,5\%$, $Met_{RASSF1A} > 12\%$ и $Met_{RUNX3} > 10\%$ НЭО ПЖ характеризовались более выраженным злокачественным потенциалом, высокими рисками метастазирования и, следовательно, неблагоприятным исходом заболевания.

Заключение. Таким образом, с помощью метода пиросеквенирования в спорадических высококодифференцированных НЭО ПЖ был определен статус метилирования 8 генов-онкосупрессоров AHRR, APC, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A, RUNX3 и ретротранспозона LINE1. Считая пороговым значением для метилирования промоторного региона гена показатель 10%, мы установили, что наиболее часто в статусе гиперметилирования находились гены APC, RASSF1A, RUNX3, MGMT и, соответственно, гипометилирования - DAPK, MLH1, AHRR, P16. При этом между гормонально активными и неактивными НЭО ПЖ прослеживалась выраженная тенденция к различию паттернов метилирования, заключающаяся характерным явлением глобального гиперметилирования генома, а также гипометилированием промоторов генов RASSF1A и MLH1 в гормонально активных НЭО ПЖ.

Анализ полученных результатов пиросеквенирования ретротранспозона LINE1 позволил установить глобальное гипометилирование в 82,8% НЭО ПЖ.

Сопоставив клинические наблюдения с данными об эпигенетических изменениях генома изученных образцов НЭО ПЖ, мы определили некоторые закономерности, которые позволили предположить прогностическую роль метилирования выбранных генов-кандидатов. По-нашему мнению, использование статуса метилирования для составления прогноза НЭО ПЖ и выбора тактики ведения пациентов является наиболее современным и перспективным.

Наше исследование имело ряд ограничений, связанных с включением в выборку только спорадических высококодифференцированных НЭО ПЖ, в связи с чем метиляторный фенотип данных опухолей нуждается в дальнейшем изучении.

Список литературы

1. Kit O.I., Trifanov V.S., Petrusenko N.A., Gvaldin D.Y., Kutilin D.S., Timoshkina N.N. Identification of New Candidate Genes and Signalling Pathways Associated With the Development of Neuroendocrine Pancreatic Tumours Based on Next Generation Sequencing Data. Mol. Biol.

Rep. 2020. vol. 47. no. 6. P. 4233-4243.

2. Marinoni I., Kurrer A.S., Vassella E. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology*. 2014. vol. 146. no. 2. P. 453-460.

3. Кит О.И., Дерижанова И.С., Карнаухов Н.С., Новикова И.А., Ульянова Е.П., Трифанов В.С. Скрининг нейроэндокринного компонента в раке желудка // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25092> (дата обращения: 20.05.2021).

4. Karpathakis A., Dibra H., Thirlwell C. Neuroendocrine tumours: cracking the epigenetic code. *Endocr Relat Cancer*. 2013. vol. 20. no. 3. P. 65-82. DOI: 10.1530/ERC-12-0338

5. Pavel M., O'Toole D., Costa F., Capdevila J., Gross D., Kianmanesh R., Krenning E., Knigge U., Salazar R., Pape U-F., Oberg K. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. *Neuroendocrinology*. 2016. vol. 103. no. 2. P. 172-185.

6. Tirosh A., Killian J.K., Petersen D., Zhu Y.J., Walker R.L, Blau J.E., Nilubol N., Patel D., Agarwal S.K., Weinstein L.S., Meltzer P., Kebebew E. Distinct DNA Methylation Signatures in Neuroendocrine Tumors Specific for Primary Site and Inherited Predisposition. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2020. vol. 1. no. 10. P. 477. DOI: 10.1210/clinem/dgaa477.

7. Владимирова Л.Ю., Сторожакова А.Э., Снежко Т.А., Страхова Л.К., Абрамова Н.А., Кабанов С.Н. и др. Гормоноположительный HER2-негативный метастатический рак молочной железы: принятие решений в реальной клинической практике // *Южно-российский онкологический журнал*. 2020. Т. 1. № 2. С. 46-51.

8. Kaderli R.M., Spanjol M., Kollár A., Bütikofer L., Gloy V., Dumont R.A., Seiler C.A., Christ E.R., Radojewski P., Briel M., Walter M.A. Therapeutic Options for Neuroendocrine Tumors. *JAMA Oncol*. 2019. vol. 5. no. 4. P. 480.

9. Keutgen X.M., Kumar S., Gara S., Boufrajech M., Agarwal S., Hruban R.H., Nilubol N., Quezado M., Finney R., Cam M., Kebebew E. Transcriptional alterations in hereditary and sporadic nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors according to genotype. *Cancer*. 2018. vol. 124. no. 3. P. 636-647.

10. Dasari A., Shen C., Halperin D., Zhao B., Zhou S., Xu Y., Shih T., Yao J.C. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017. vol. 3. no. 10. P. 1335-1342. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0589.

11. Malpeli G., Amato E., Dandrea M., Fumagalli C., Debattisti V., Boninsegna L., Pelosi G.,

Falconi M., Scarpa A. Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors. *BMC Cancer*. 2011. vol. 11. no. 3. P. 351. DOI: 10.1186/1471-2407-11-351.

12. Fotouhi O., Adel Fahmideh M., Kjellman M., Sulaiman L., Höög A., Zedenius J. Global hypomethylation and promoter methylation in small intestinal neuroendocrine tumors: an in vivo and in vitro study. *Epigenetics*. 2014. vol. 9. no. 7. P. 987-997.

13. Lakis V., Lawlor R.T., Newell F., Patch A.M., Mafficini A., Sadanandam A., Koufariotis L.T., Johnston R.L. DNA methylation patterns identify subgroups of pancreatic neuroendocrine tumors with clinical association. *Commun Biol*. 2021. vol. 3. no. 4. P. 155. DOI: 10.1038/s42003-020-01469-0.