

ОЦЕНКА CpG-МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ APC И P16 У ПАЦИЕНТОК С ДИАГНОСТИРОВАННЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

Вереникина Е.В., Меньшенина А.П., Адамян М.Л., Арджа А.Ю., Кечерюкова М.М.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: ekat.veren@yandex.ru

Аберрантное метилирование CpG-островков в регуляторных областях генома считается важным механизмом канцерогенеза, включая рак яичников (РЯ). Целями настоящего исследования были оценка статуса метилирования генов-онкосупрессоров APC и p16 в опухолевых образцах пациенток с диагнозом «рак яичников» и определение их прогностического значения. В исследование были включены 78 женщин в возрасте 27–70 лет с первичным диагнозом «рак яичников T1-3cN0-1M0-1 (стадия II-IV)». Количественный анализ CpG-метилирования APC и P16 был проведен методом пиросеквенирования. В исследовании 43 образца РЯ (55%) продемонстрировали CpG-гиперметилирование хотя бы по одному гену, 35 из них (45%) были гиперметилированы по двум генам одновременно. В подгруппе гиперметилированных опухолей отмечено статистически достоверное повышение уровня CpG-метилирования APC и P16 в 4,5 ($p < 0,0001$) и 5,6 ($p = 0,002$) раза соответственно. Уровень метилирования не зависел от возраста больных. Одновременное гиперметилирование опухоли по APC и P16 повышает в 4 раза риск рецидивирования заболевания в течение последующих 48 месяцев (RR=4,06; CI% 2,149–7,668). Таким образом, у пациенток с диагнозом «рак яичников» уровень метилирования промотора APC и гена P16 в опухолевой ткани достоверно увеличен относительно условно нормальной ($p < 0,000$, $p = 0,002$, соответственно) в 36,0% и 45,0% случаев. В случаях одновременного гиперметилирования опухоли по APC и P16 обнаружена достоверная ассоциация с повышенным риском рецидивирования заболевания. Поэтому использование двух эпигенетических маркеров может быть эффективно для прогнозирования течения заболевания.

Ключевые слова: рак яичников, метилирование, APC, P16.

EVALUATION OF CpG-METHYLATION OF APC AND P16 GENES IN PATIENTS WITH DIAGNOSED OVARIAN CANCER

Verenikina E.V., Menshenina A.P., Adamyan M.L., Ardzha A.Y., Kecheryukova M.M.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: ekat.veren@yandex.ru

Aberrant methylation of CpG islands in the regulatory regions of the genome is considered an important mechanism of carcinogenesis, including ovarian cancer (OC). The aim of this study was to assess the methylation status of the APC and p16 genes in tumor samples from patients diagnosed with ovarian cancer and to determine their association with clinical prognosis. The study included 78 women aged 27–70 years with a primary diagnosis of ovarian cancer T1-3cN0-1M0-1 (St II-IV). Quantitative analysis of the CpG methylation of the APC and P16 was carried out by pyrosequencing. In a study, 43 samples (55%) demonstrated CpG-hypermethylation in at least one gene, 35 of them (45%) were hypermethylated in two genes simultaneously. There was a statistically significant increase in the level of CpG-methylation of APC and P16 by 4.5 ($p < 0,0001$) and 5.6 ($p = 0,002$) times, respectively. The methylation level did not depend on the age of the patients. Simultaneous tumor hypermethylation by APC and P16 increases the risk of disease recurrence by 4 times during the next 48 months (RR=4.06; CI% 2.149–7.668). Thus, in patients diagnosed with ovarian cancer, the level of methylation of the APC promoter and the P16 gene in the tumor tissue was significantly increased relative to the conditionally normal ($p < 0.000$, $p = 0.002$, respectively) in 36.0% and 45.0% of cases. In cases of simultaneous hypermethylation of the tumor by APC and P16, a significant association was found with an increased risk of relapse of the disease. Therefore, the use of two epigenetic markers can be effective for predicting the course of the disease.

Keywords: ovarian cancer, methylation, APC, P16.

Рак яичников (РЯ) – относительно редкая онкопатология с внушительным грузом генетических изменений, обуславливающих как наследственные, так и спорадические случаи заболевания, что дает возможность прогнозировать генетические риски для определения стратегий лечения, в том числе раннего хирургического вмешательства [1–4].

Эпигенетическая составляющая в виде метилирования ДНК может играть важную роль в патогенезе РЯ. Согласно современным представлениям онкогенная трансформация инициируется благодаря совместному репрограммированию генома и эпигенома, что приводит к изменению экспрессии генов [5].

Аналогично опухолям различных локализаций уровень метилирования ДНК в РЯ демонстрирует глобальное гипометилирование с областями фокального гиперметилирования, чаще в промоторах классических опухолевых супрессоров и генов репарации. В то же время отмечена гистотип-ассоциированная специфичность рисунка метилирования при РЯ [6, 7]. Метилирование ДНК в норме служит барьером для клеточного репрограммирования и онкогенеза. Аберрантное метилирование может быть результатом соматических эпимутаций, которые возникают и накапливаются в течение жизни, или/и «конституционных» эпимутаций, индуцированных в раннем эмбриогенезе. Исследования, привлекающие возможности NGS-технологии, позволили выявить высокоспецифичное дифференциальное метилирование генома как при РЯ, так и на предраковых стадиях, что доказывает ранние изменения эпигенома и возможность потенциального их использования в качестве биомаркеров [8]. В итоге специфичность эпигенетического профиля ДНК опухоли может помочь разделить пациентов на группы риска, рецидива, ответа на химиотерапию и прогноза [1, 9].

Цель исследования. В настоящем исследовании были изучены уровни метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров *APC* и *P16* в опухолевой ткани яичника по сравнению с условно нормальной тканью.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 78 женщин в возрасте 27–70 лет с первичным диагнозом «рак яичников T1-3cN0-1M0-1, гр. 2 (стадия II-IV)», проходивших плановое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в 2015–2019 гг. По морфологической структуре преобладали серозные карциномы низкой и высокой степени злокачественности. Все пациентки подписали информированное согласие на обработку персональных данных и передачу сведений, составляющих врачебную тайну, и на передачу биологического материала.

Материалом исследования служили образцы ДНК, экстрагированные из парафиновых блоков опухолевой и условно здоровой ткани, как описано ранее [10]. Количественный анализ CpG-метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров *APC* и *P16* был проведен методом пиросеквенирования бисульфит-конвертированной ДНК согласно [10]. Для определения метилирования семи CpG-сайтов в позициях с +148 по +182 гена *P16* использовали набор праймеров PyroMark Q24 CpG p16. По результатам пробных экспериментов для наработки ампликонов, специфичных по отношению к промотору гена *APC*, и собственно для пиросеквенирования были выбраны праймеры: F - 5' biotin –

ttttgtttgttggggatt 3'; R - 5' actacaccaataacaaccacatatac 3'; seq - 5' acacaactactctctctcc 3'. Дизайн праймеров был осуществлен в программе MethPrimer 2.0. Праймеры были подобраны на основе бисульфит-конвертированных последовательностей, содержащих специфичные CpG-сайты. Первичную обработку пирогрaмм проводили в программе PyroMark. Показатель Met (%) для каждого образца рассчитывали как медиану показателей метилирования CpG-сайтов трех повторов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрических критериев (медианы, интерквартильного интервала, коэффициента Манна–Уитни). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Показатели уровня CpG-метилирования (Met, %) для каждого гена представлены в таблице 1.

Таблица 1

Метилирование (Met) CpG-локусов *APC* и *P16* в условно нормальной и опухолевой тканях у пациенток с РЯ

Ген	Группа	n (%)	Медиана Met, %	Интерквартильный интервал Met, %		Достоверность различий уровней Met по сравнению с условно нормальной тканью в U-тесте, p	Достоверность различий уровней Met в группах Met_H и Met_L в U-тесте, p
				2,0	6,0		
<i>APC</i>	N	78 (100)	4	2,0	6,0		
	Met-H	28 (36)	18	11,8	35,8	6,04; p<0,000	
	Met-L	60 (64)	4	2,0	8,0	0,32; p=0,749	3,5; p<0,000
	C	78 (100)	5,8				
<i>P16</i>	N	78 (100)	3	1,0	5,0		
	Met-H	35 (45)	23,5	16,0	42,9	4,89; p<0,000	

Met-L	43 (65)	4,5	8,2	10,5	3,13; p=0,002	3,1; p<0,001
C	78 (100)	8				

Примечание: N – условно нормальная ткань (норма); Met-H – образцы опухоли с Met, превышающим 10%; Met-L – образцы опухоли с Met, не превышающим 10%; C – образцы опухоли суммарно.

Во всех образцах условно нормальной ткани был зарегистрирован «фоновый» уровень метилированных участков исследованных генов, составивший для промотора *APC* 4%, для 1 экзона *P16* – 3%.

Опухолевые образцы продемонстрировали гетерогенность – по каждому гену зафиксированы случаи как гиперметиличивания, так и незначительного метилирования (подгруппы Met-H и Met-L соответственно). В подгруппе Met-H отмечено статистически достоверное повышение уровня CpG-метиличивания *APC* и *P16* в 4,5 и 5,6 раза соответственно. Более того, метилирование промоторных участков генов в подгруппе Met-H было статистически достоверно выше, чем в подгруппах условно нормальной ткани, и Met-L по всем генам при высоком уровне значимости ($p<0,001$). В группу Met-L по гену *P16* вошли образцы опухоли с метилированием не выше 10%, однако и это позволило дифференцировать ее от условно нормальной ткани.

В целом, 43 образца РЯ (55%) продемонстрировали CpG-гиперметиличивание хотя бы по одному гену, 35 из них (45%) были гиперметиличиваны по двум генам одновременно.

В течение жизни метилирование генома меняется постоянно под влиянием окружающей среды и генетической предрасположенности. С возрастом происходит падение уровня ДНК-метиличивания, но локально увеличение транскрипционной репрессии генов-супрессоров опухолей, что определило введение термина «эпигенетические часы» как одного из механизмов старения. В настоящем исследовании определение ассоциаций возраста пациенток с уровнем метилирования CpG-сайтов не выявило значимой корреляции ($p=0,385$ для *APC*, $p=0,489$ для *P16*). Ранее было показано отсутствие ассоциаций между возрастными, гендерными, гистологическими показателями и статусом CpG-метиличивания генов *APC* и *P16* в неопластических образованиях толстой кишки и желудка [10, 11].

В ретроспективной группе из 78 пациенток, вошедших в исследование, в 36% случаев развился рецидив в интервале от 7 до 48 месяцев наблюдения. На рисунке 1 проиллюстрировано влияние статуса метилирования *APC* и *P16* на частоту рецидивов у пациенток с РЯ после проведения предусмотренного комплексного лечения. Неблагоприятный исход заболевания наблюдали у 68% пациенток в группе с

гиперметилированием промотора *APC* и у 56% пациенток в группе с гиперметилированием *P16*.

При этом одновременно гиперметилирование *APC* и *P16* было обнаружено у 19 из 28 пациенток с рецидивом. Дальнейший анализ продемонстрировал относительно сильную связь между развитием неблагоприятных событий у больных РЯ и эпигенетическими изменениями *APC*, *P16* (OR=12,365, CI95% 12,4–34,2). В итоге наличие гиперметилирования *APC* и *P16* в опухоли повышает в 4 раза риск рецидивирования в течение последующих 48 месяцев. Использование двух маркеров может быть эффективно для прогнозирования заболевания (Se = 67,9%, Sp= 85,4%).

Анализ статуса CpG-островков исследованных сайтов в злокачественных опухолях яичника различных стадий по классификации TNM продемонстрировал некоторое повышение уровня метилирования, однако наблюдаемый тренд не был статистически значим, возможно, из-за недостаточного объема выборки.

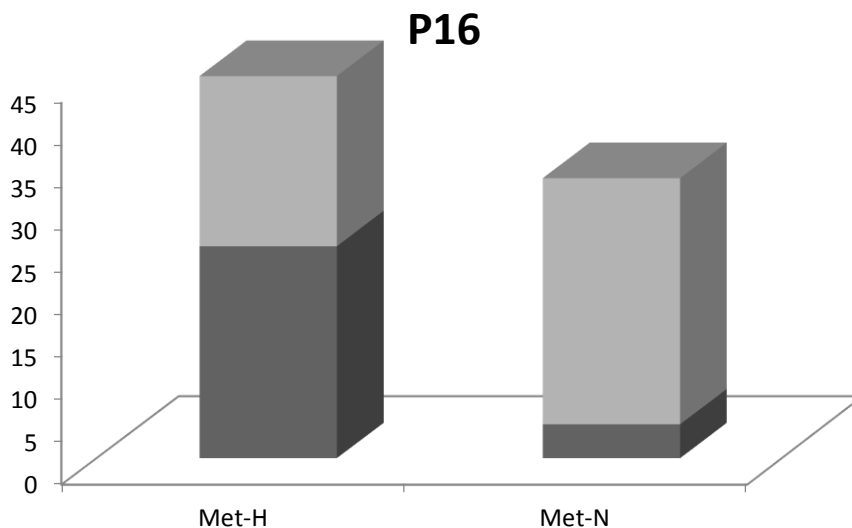
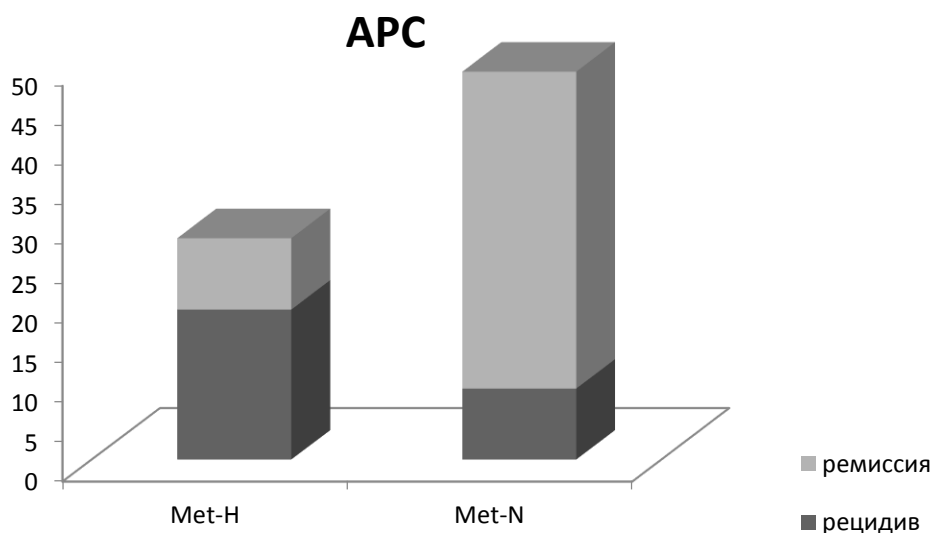


Рис. 1. Частота неблагоприятных событий у пациенток с разным статусом метилирования APC и P16 (Met-H – гиперметилирование, Met-N – нет значимого метилирования)

Несмотря на достижения в исследовании опухолевой микросреды и геномной гетерогенности в сочетании с многочисленными клиническими испытаниями новых лекарственных средств, 5-летняя относительная выживаемость, составляющая при распространенном раке яичников около 30–40%, практически не улучшилась за последние два десятилетия [9]. Эпигенетическая регуляция оказалась важным дополнительным механизмом, влияющим на инициацию и развитие рака яичников, который добавляет еще одно измерение для стратификации пациентов в целях определения тактики лечения [9, 12].

Фенотип aberrантного «метилирования» был описан для многих гематологических и солидных злокачественных новообразований, где он обуславливает дерегуляцию сигнальных путей, контролирующих развитие, дифференцировку, клеточный цикл, ДНК репарацию, апоптоз [9, 13, 14].

В настоящем исследовании было выявлено дифференциальное метилирование между условно нормальной тканью яичника и РЯ (табл. 1). Этот факт имеет потенциальную ценность для скрининга группы риска развития РЯ. Считается, что изменение метилирования ДНК происходит на ранних стадиях развития опухолей, способствуя канцерогенезу, и, таким образом, эти данные могут быть использованы в качестве скрининговых панелей биомаркеров. Ранее Pisanic с соавторами идентифицировал панель из трех генов (*c17orf64*, *IRX2* и *TUBB6*) с паттернами метилирования, которые различают нормальные и опухолевые образцы [8]. Другие исследователи в своих работах выявили гены, промоторы которых гиперметилированы в образцах РЯ (Е-кадгерин или *CDH1*, Н-кадгерин, *BRCA1*, *RASSF1A*, *APC*, *p14 ARF*, *p16INK4A*, *DAPK*, *RUNX3*, *TFPI2*, *SFRP5* и *OPCM*), имеют лучшую чувствительность и специфичность, чем СА-125, некоторые даже обнаруживаются в сыворотке или плазме [15, 16].

Ген аденоматозного полипоза толстой кишки (*APC*), известный опухолевый супрессор, расположен на длинном плече 5-й хромосомы (5q21-q22). Исследования *APC* обычно были сосредоточены на мутациях, вызывающих семейный аденоматозный полипоз. Однако гиперметилирование, которое является одним из ключевых эпигенетических изменений последовательности *APC*, также связано с канцерогенезом при различных формах рака [10, 11]. Одним из наиболее известных механизмов реализации онкосупрессорной функции *APC* служит регуляция сигнального пути Wnt / β - catenin [17]. В выборке из 78 пациенток нами было выявлено гиперметилирование CpG-островков в промоторном участке *APC* в 28 случаях (36%). При этом достоверных различий между подгруппой Met-H (Met <10%) и условно

нормальной тканью не обнаружено. Ранее на основе метаанализа данных 12 исследований было показано отсутствие существенной ассоциации между гиперметилированием промотора *APC* и стадией серозного РЯ [18]. В настоящей работе статус метилирования промотора *APC* был достоверно связан с частотой неблагоприятных событий.

P16^{INK4} (также известный как *CDKN2A*), классический онкосупрессор, расположен на хромосоме 9p21 и играет важную роль в регуляции клеточного цикла путем замедления перехода клеток от фазы G1 к S. Известно, что экспрессия *P16* снижается путем метилирования ДНК [19]. Кроме того, инактивация *P16* активирует белок ретинобластомы (RB) путем стимуляции циклинзависимых киназ (CDK) и пути RB, что приводит к нарушению клеточной пролиферации и апоптоза, тем самым еще больше способствуя канцерогенезу. Действительно, некоторые виды рака, включая рак яичников, демонстрируют фенотип метилирования *P16* [12, 20]. В наборах данных Atlas Genome Atlas уровни метилирования семи из девяти сайтов CpG были значительно повышены в тканях опухоли яичника по сравнению с нормальными тканями.

В настоящем исследовании образцы злокачественных неоплазий яичников продемонстрировали повышенный уровень метилирования 1 экзона *P16*. Все 78 образцов были гиперметилированы или демонстрировали повышенный уровень значения Met относительно контроля. В этом случае выделение гиперметилированной группы актуально для оценки прогностической значимости маркера. Результаты настоящего исследования показали, что именно в группе Met-H (гиперметилированного *P16*, Met >0%) частота неблагоприятных событий была значимо выше.

Выводы

Таким образом, у пациенток с диагнозом «рак яичников» уровень метилирования промотора *APC* и гена *P16* в опухолевой ткани достоверно увеличен относительно условно нормальной ткани ($p < 0,000$ и $p = 0,002$ соответственно) в 36,0% и 45,0% случаев. В случаях одновременного гиперметилирования опухоли по *APC* и *P16* обнаружена достоверная ассоциация с повышенным риском рецидивирования заболевания.

Список литературы

1. Krushkal J., Silvers T., Reinhold W.C., Sonkin D., Vural S., Connelly J., Varma S., Meltzer P.S., Kunkel M., Rapisarda A., Evans D., Pommier Y., Teicher B.A. Epigenome-wide DNA methylation analysis of small cell lung cancer cell lines suggests potential chemotherapy targets. Clin Epigenet. 2020. Vol. 12. P. 93. DOI: 10.1186/s13148-020-00876.

2. Кит О.И., Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н., Пржедецкий Ю.В., Хохлова О.В. Молекулярная биология семейных случаев меланомы человека // Вопросы онкологии. 2015. Т. 61. № 6. С. 889-897.
3. Кит О.И., Гвалдин Д.Ю., Трифанов В.С., Колесников Е.Н., Тимошкина Н.Н. Молекулярно-генетические особенности нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы // Генетика. 2020. Т.56. № 2. С. 142-160. DOI: 10.31857/S001667582002006X.
4. Гвалдин Д.Ю., Омельчук Е.П., Тимошкина Н.Н., Трифанов В.С., Сидоренко Ю.С. Современные представления о молекулярных механизмах в онкогенезе гастроинтестинальных стромальных опухолей // Вопросы онкологии. 2020. Т. 66. № 1. С. 13-22.
5. Moselhy S.S., Kumosani T.A., Kamal I.H., Jalal J.A., Jabaar H.S., Dalol A. Hypermethylation of P15, P16, and E-cadherin genes in ovarian cancer. *Toxicol Ind Health*. 2015. Vol. 31 (10). P. 924-930.
6. Natanzon Y., Goode E.L., Cunningham J.M. Epigenetics in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018; 51: 160-169. doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.003
7. Engqvist H., Parris T.Z., Biermann J., Ronnerman E.W., Larsson P., Sundfeldt K., Kovacs A., Karlsson P., Helou K. Integrative genomics approach identifies molecular features associated with early-stage ovarian carcinoma histotypes. *Sci Rep*. 2020. Vol. 10 (1). P. 7946. DOI: 10.1038/s41598-020-64794-8.
8. Pisanic T.R., Wang Y., Sun H., Considine M., Li L., Wang T-H, Wang T-L, Shih I-M. Methylomic Landscapes of Ovarian Cancer Precursor Lesions. *Clin Cancer Res*. 2020. Vol. 26. P. 6310-6320. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0270.
9. Reid B.M., Permuth J.B., Sellers T.A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer biology & medicine*. 2017. Vol. 14. P. 9-32. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084.
10. Кит О.И., Водолажский Д.И., Двадненко К.В., Ефимова И.И., Олейникова Е.Н., Олейников Д.Д., Тимошкина Н.Н. Абберрантное метилирование промоторных участков генов APC, CDH13 и MGMT у больных колоректальным раком // Сибирский онкологический журнал. 2016. Т. 15. № 2. С. 48-55.
11. Timoshkina N.N., Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Soldatkina N.V., Gevorkyan Y.A., Samoylenko N.S., Kharagezov D.A., Duritskiy M.N, Dashkov A.V., Kaymakchi D.O., Petrov D.S., Ilchenko S.A., Sustretov V.A., Vladimirova L.Y.. Changes in CpG methylation of APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16 and RASSF1A in gastric adenocarcinoma. *Annals of Oncology*. 2018. Vol. 29. Suppl.8. P. 648.
12. Eskander R.N. The Epigenetic Landscape in the Treatment of Gynecologic Malignancies. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting. 2018. Vol. 38. P. 480-487. DOI: 10.1200/edbk_200203.

13. Кит О.И., Водолажский Д.И., Колесников Е.Н., Тимошкина Н.Н. Эпигенетические маркеры малигнизации тканей пищевода: метилирование ДНК // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 5. С. 520-526.
14. Mahmood N., Rabbani S.A. DNA methylation readers and cancer: mechanistic and therapeutic applications. *Front Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 489.
15. Koukoura O., Spandidos D. A., Daponte A., Sifakis S. DNA methylation profiles in ovarian cancer: implication in diagnosis and therapy (Review). *Molecular medicine reports.* 2014. Vol. 10. P. 3-9. DOI: 10.3892/mmr.2014.2221.
16. Teschendorff A.E., Menon U., Gentry-Maharaj A., Ramus S.J., Gayther S.A., Apostolidou S., Jones A., Lechner M., Beck S., Jacobs I.J., Widschwendt M. An Epigenetic Signature in Peripheral Blood Predicts Active Ovarian Cancer. *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4 (12). P. e8274. DOI: 10.1371/journal.pone.0008274.
17. Stefanski C.D., Prosperi J.R. Wnt-Independent and Wnt-Dependent Effects of APC Loss on the Chemotherapeutic Response. *Int J. Mol Sci.* 2020. Vol. 21 (21). P. 7844. DOI: 10.3390/ijms21217844.
18. Shen C., Sheng Q., Zhang X., Fu Y., Zhu K. Hypermethylated APC in serous carcinoma based on a meta-analysis of ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 2016. Vol. 9 (1). P. 60. DOI: 10.1186/s13048-016-0271-6.
19. Gao S.J., Zhang G.F., Zhang R.P. High CpG island methylation of p16 gene and loss of p16 protein expression associate with the development and progression of tetralogy of Fallot. *J. Genet.* 2016. Vol. 95. P. 831-837.
20. Zuberi M., Dholariya S., Khan I., Mir R., Guru S., Bhat M., Sumi M., Saxena A. Epigenetic Silencing of DAPK1 and p16^{INK4a} Genes by CpG Island Hypermethylation in Epithelial Ovarian Cancer Patients. *Ind J. Clin Biochem.* 2021. Vol. 36. P. 200-207. DOI: 10.1007/s12291-020-00888-4.