

А.А. Евдокимов¹, Н.А. Нетесова¹, Н.А. Сметанникова¹, М.А. Абдурашитов¹, А.Г. Акишев¹,
Е.С. Давидович¹, Ю.Д. Ермолаев², А.Б. Карпов², А.Э. Сазонов², Р.М. Тахауов²,
С.Х. Дегтярев¹

Применение метода GLAD-ПЦР анализа для выявления сайтов метилирования в регуляторных областях генов-онкосупрессоров *ELMO1* и *ESR1* при колоректальном раке

¹ ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, р.п. Кольцово

² ФГУП «Северский биофизический научный центр» ФМБА России, г. Северск, Томская область

Аберрантное метилирование регуляторных областей генов-онкосупрессоров показано для многих онкологических заболеваний. Разработанный нами ранее метод GLAD-ПЦР анализа был применен для выявления сайтов R(5mC)GY, возникающих при аберрантном метилировании регуляторных областей генов *ELMO1* и *ESR1* в препаратах ДНК клеточной линии SW837 и тканей опухоли толстой кишки. Отобрано по 4 сайта для каждого гена и установлено, что в ДНК линии SW837 наиболее метилированными являются сайт GCGC в первом экзоне гена *ELMO1* и сайт GCGT в промоторе гена *ESR1*. Сайт GCGT в промоторе гена *ESR1* слабо метилирован в нормальных тканях и метилирован в большинстве опухолевых тканей. Сайт GCGC в первом экзоне гена *ELMO1* неметилирован в ДНК нормальных тканей и метилирован в 60% образцов опухолевых ДНК. Обсуждаются возможности применения GLAD-ПЦР анализа препаратов внеклеточной ДНК крови пациентов для диагностики колоректального рака.

Ключевые слова: метилирование ДНК, гены-онкосупрессоры, колоректальный рак, ПЦР

Метилирование ДНК играет важную роль в развитии онкологических заболеваний. На ранних стадиях канцерогенеза происходит метилирование *de novo* регуляторных областей ряда генов, что приводит к выключению их экспрессии, тогда как в здоровой ткани данные области неметилированы и соответствующие гены активны [6]. Такое ненормальное (аберрантное) метилирование было показано для целого ряда генов-онкосупрессоров в опухолевых тканях [2,6], причем, набор этих генов отличается в различных опухолях [11]. В частности, для колоректального рака показано наличие аберрантного метилирования более 50 генов [5,8,9,12,15].

У млекопитающих метилирование ДНК *de novo*, включая и аберрантное метилирование, осуществляют ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b, которые узнают сайт 5'-RCGY-3' и модифицируют внутренний CG-динуклеотид с образованием последовательности 5'-R(5mC)GY-3' в обеих цепях ДНК [7], где R – А или G, Y – Т или С, 5mC – 5-метилцитозин. В дальнейшем, метилирование вновь образованных модифицированных сайтов поддерживается в ходе репликации ДНК с помощью ДНК-метилтрансферазы Dnmt1. Недавно обнаруженная метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза Glaf узнает и расщепляет именно сайт R(5mC)↓GY [13], что делает ее удобным инструментом для выявления метилированных *de novo* сайтов в ДНК человека. Ранее на основе фермента Glaf нами был разработан метод GLAD-ПЦР анализа, позволяющий выявлять наличие молекул ДНК с сайтом R(5mC)GY в заданном положении генома человека даже в условиях избытка других молекул ДНК, где этот сайт неметилирован [3].

Целью данной работы явилось изучение возможности использования GLAD-ПЦР анализа для определения аберрантного метилирования сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов *ELMO1* и *ESR1* в препаратах ДНК из опухолевых тканей при колоректальном раке.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из образцов ткани опухоли толстой кишки и здоровой ткани больных колоректальным раком. Во всех случаях злокачественного новообразования диагноз был подтвержден морфологически (аденокарцинома различной степени дифференцировки). По стадии заболевания больные распределялись следующим образом: 2 больных (номера пациентов 1 и 76) имели I стадию заболевания (T1N0M0), 3 пациента (номера 16, 20 и 37) – II стадию (T2N0M0), 6 больных (номера пациентов 2, 19, 31, 50, 54 и 56) – III стадию (T1-4N1-2M0) и у 4 больных был диагностирован генерализованный колоректальный рак (наличие отдаленных метастазов (M1 при любых вариантах размера опухоли

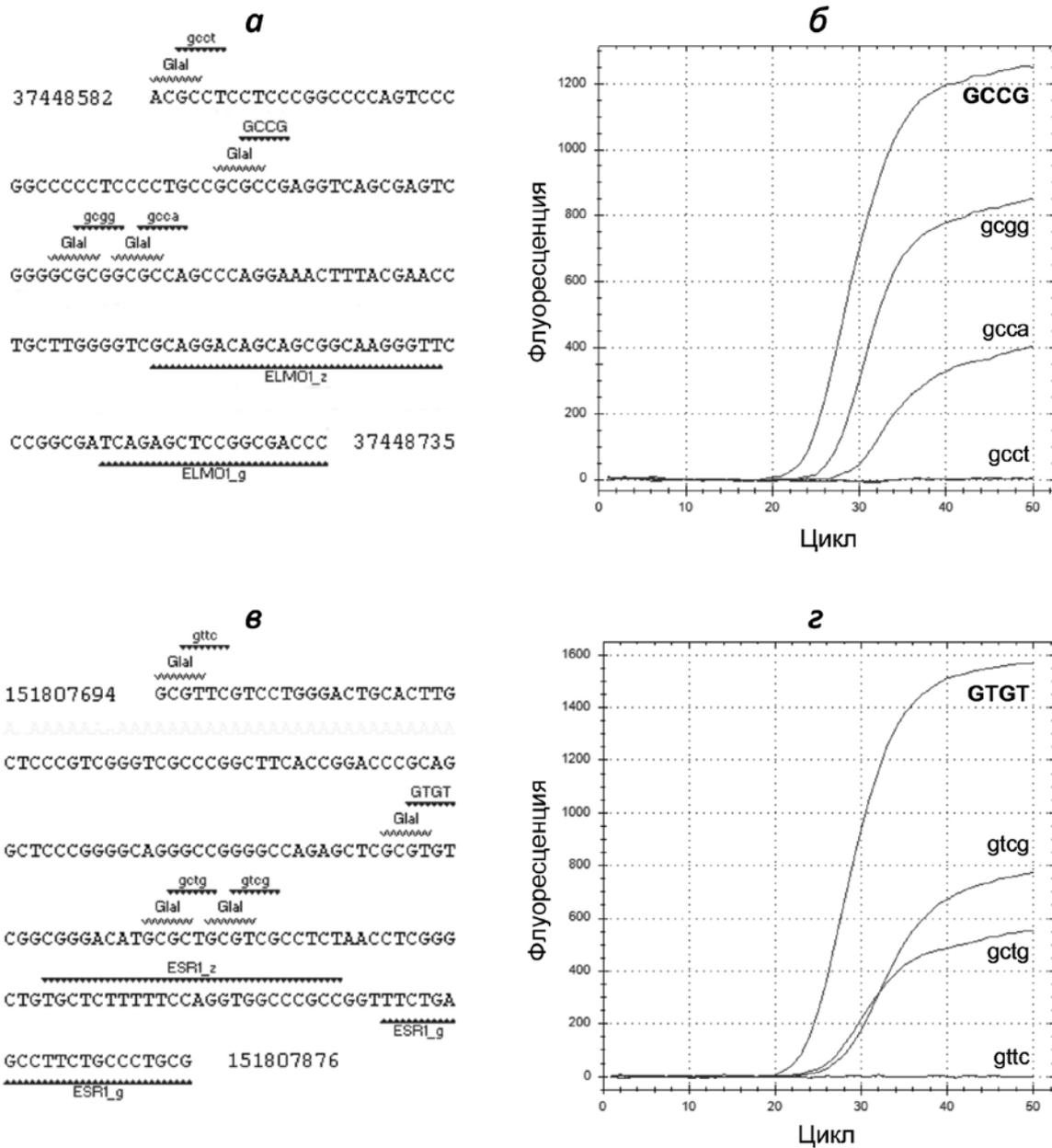


Рис. 1. Анализ статуса метилирования сайтов RCGY

(а) – фрагмент нуклеотидной последовательности регуляторной области гена ELMO1. Показаны сайты RCGY, участки связывания геномного праймера, зонда и 3'-концевого тетра nukлеотида в гибридных праймерах; (б) – кривые накопления флуоресценции в ходе ПЦР в режиме реального времени с использованием различных гибридных праймеров. Заглавными буквами “GCCG” на рисунках обозначен 3'-концевой тетра nukлеотид гибридного праймера, соответствующего точке гидролиза ДНК по наиболее метилированному сайту; (в) и (г) – аналогичные данные для гена ESR1. Цифры перед нуклеотидной последовательностью и после нее – координаты по версии генома человека GRCh38.p2 из базы данных GenBank.

(Т) и наличия или отсутствия метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (N)) (пациенты номер 25, 51, 59 и 75). У всех доноров биологического материала было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Образцы ткани опухолей (n=15), полученные при выполнении оперативного вмешательства, помещались в пробирку, содержащую раствор RNA-later и хранились в течение суток в холодильнике при температуре +4°C, затем переносились в морозильную камеру и хранились при температуре -20°C. В качестве контрольных образцов использовались фрагменты здоровой ткани толстой кишки (n=5), которые брались на значительном удалении от опухолевого очага, на линии резекции. Процедура консервации и хранения образцов здоровой ткани была аналогична описанной для опухолевой ткани.

Выделение ДНК. Выделение и очистку ДНК из опухолевых и здоровых тканей, а также ДНК клеток аденокарциномы ободочной кишки человека линии SW837, использованной для выявления перспективных для GLAD-ПЦР анализа сайтов R(5mC)GY, проводили методом фенол-хлороформной экстракции [4].

Для GLAD-ПЦР анализа [3] использовали по 45 нг препаратов ДНК и следующие праймеры и зонды:

- ELMO1g** GGGTCGCCGGAGCTCTGA;
- ELMO1z** FAM-AACCCTTGCCGCTGCTGTCTCTGC-BHQ1;
- ELMO1h1** CCTGCTCTTTCATCGGCCA; **ELMO1h2** CCTGCTCTTTCATCGGCGG;
- ELMO1h3** CCTGCTCTTTCATCGGCCG; **ELMO1h4** CCTGCTCTTTCATCGGCCT;
- ESR1g** CGCAGGGCAGAAGGCTCAGAA;

ESR1z FAM-TGCTCTTTTCCAGGTGGCCCGCC-BHQ1;

ESR1h1 CCTGCTCTTTCATCGGTCG; **ESR1h2** CCTGCTCTTTCATCGGCTG;

ESR1h3 CCTGCTCTTTCATCGGTGT; **ESR1h4** CCTGCTCTTTCATCGGTTT.

где g – геномный праймер; z – флуоресцентно-меченный зонд; h1, h2, h3 h4 – гибридные праймеры. Анализ данных и их статистическая обработка осуществлялись с помощью программ «Bio-Rad CFX Manager v.2.1».

Результаты и обсуждение

Описание исследуемых фрагментов ДНК.

На рис. 1 представлены координаты регуляторных участков генов *ELMO1* и *ESR1*, выбранных для исследования. В случае гена *ELMO1* изучаемый участок представляет собой фрагмент CpG-островка в районе первого экзона длиной 154 нуклеотида, тогда как в гене *ESR1* определяли метилирование сайтов RCGY в участке CpG-островка длиной 183 нуклеотида в промоторной области. Как представлено на рисунке, исследуемые участки содержат по 4 сайта RCGY, которые могут подвергаться модификации в случае aberrантного метилирования и расщепляться затем ферментом Glaf.

Выявление сайтов R(5mC)GY, перспективных для GLAD-ПЦР анализа. GLAD-ПЦР анализ сайтов R(5mC)GY проводится в три этапа. Сначала ферментом Glaf расщепляются посередине все имеющиеся в ДНК сайты R(5mC)GY с образованием тупых концов. Затем ко всем полученным фрагментам ДНК подшивается уникальный адаптер, после чего ставится ПЦР с праймера, соответствующего этому адаптеру, и второго праймера, комплементарного изучаемому фрагменту ДНК. В результате при наличии огромного количества разных фрагментов, полученных после гидролиза ДНК и последующей шивки, ПЦР идет преимущественно с того фрагмента, который расположен рядом с целевым сайтом R(5mC)GY. Использование зонда, также имеющего уникальную структуру, позволяет еще больше повысить специфичность реакции.

В первой части работы проводили выявление сайтов R(5mC)GY в пределах выбранных участков регуляторных областей генов-онкосупрессоров с целью отбора наиболее метилированных сайтов для дальнейшего GLAD-ПЦР анализа клинических образцов. Для поиска таких сайтов использовали препарат ДНК из клеточной линии SW837. Для каждого из восьми сайтов RCGY, присутствующих в изучаемых фрагментах регуляторных участков генов *ELMO1* и *ESR1*, использовали соответствующий гибридный праймер.

Структура гибридного праймера для каждого эксперимента указана в методах. Гибридный

праймер представляет собой последовательность ДНК 5'-CCTGCTCTTTCATCGGYN-3', где 5'-концевая 15-ти нуклеотидная часть праймера соответствует универсальному олигонуклеотидному адаптеру, а тетра нуклеотидная часть на 3'-конце (выделена подчеркиванием) комплементарна геномной последовательности в точке гидролиза ДНК метилзависимой эндонуклеазой Glaf. Данная структура предполагает существование 32 вариантов гибридных праймеров, соответствующих различным конечным последовательностям, получаемых после гидролиза Glaf всех возможных вариантов последовательности NNR(5mC)↓GY.

На рис. 1 представлены результаты GLAD-ПЦР анализа восьми сайтов R(5mC)GY на изучаемых регуляторных участках генов *ELMO1* и *ESR1*. В том и другом случае GLAD-ПЦР анализ показывает метилирование трех сайтов RCGY, расположенных один за другим рядом с последовательностью зонда. При этом, однако, для обоих генов наибольшая степень метилирования наблюдается в третьем по счету сайте от положения зонда (на рисунке его концевая тетра нуклеотидная последовательность приведена прописными буквами). Соответственно, в дальнейшей работе проводили GLAD-ПЦР анализ сайта GCGC в положении 37448622 на седьмой хромосоме (первый экзон гена *ELMO1*) и сайта GCGT в положении 151807784 на шестой хромосоме (промотор гена *ESR1*).

GLAD-ПЦР анализ сайтов метилирования в препаратах ДНК из образцов тканей. Исследовали ДНК из образцов операционного материала опухолей (n=15) и нормальной слизистой кишечника (n=5) больных колоректальным раком. GLAD-ПЦР анализ двух установленных сайтов GCGC и GCGT в регуляторных участках генов *ELMO1* и *ESR1* осуществляли с использованием препаратов ДНК из образцов тканей, выделенных, как описано в методическом разделе.

GLAD-ПЦР анализ двух выбранных сайтов проводили в трех повторах, в каждом из которых анализируемый образец ДНК содержал 10³ копий гена *ELMO1* или *ESR1*. В табл. 1 представлены полученные результаты GLAD-ПЦР анализа в виде средних значений числа циклов амплификации (Cq) с указанием величин отклонений; а на рис. 2 — в виде диаграммы.

В таблице в случае сайта GCGT в промоторе гена *ESR1* значения Cq для четырех препаратов ДНК из здоровых тканей варьируют от 25,75 до 26,76, и у одного препарата эта величина составляет 31,53. Таким образом, данный сайт слабо метилирован в четырех образцах нормальных тканей и практически неметилирован в образце 56Т. Из рис. 2 следует, что в препаратах ДНК из опухолевых тканей величина Cq меньше, чем

ESR1

ELMO1

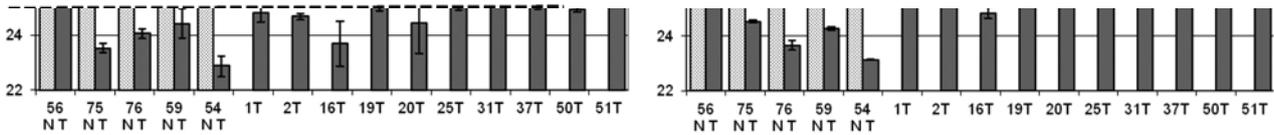


Рис.2 Число циклов амплификации Cq для ДНК исследованной группы тканей. По оси абсцисс - номера образцов ("N" - норма, "Т" - опухоль), по оси ординат - средние значения Cq по результатам трех повторов с указанием разброса данных. Пунктирными линиями обозначены минимальные значения Cq, полученные для нормальных тканей.

Таблица 1.

Число циклов амплификации (Cq) с указанием среднеквадратичных отклонений (получено по результатам GLAD-ПЦР анализа)

Ген	Тип ткани	Номера образцов															
		56	75	76	59	54	1	2	16	19	20	25	31	37	50	51	
ESR1	Норма	31,53 ±1,54	25,75 ±0,30	27,08 ±0,07	26,36 ±0,30	26,76 ±0,34											
	Опухоль	26,76 ±0,30	23,51 ±0,17	24,06 ±0,17	24,41 ±0,54	22,87 ±0,37	24,8 ±0,35	24,67 ±0,10	23,68 ±0,82	25,35 ±0,49	24,44 ±1,12	25,78 ±0,89	27,55 ±0,33	25,05 ±0,11	24,93 ±0,08	25,45 ±0,16	
ELMO1	Норма	>34	31,35 ±0,40	29,34 ±0,08	>34	31,34 ±2,00											
	Опухоль	27,21 ±0,40	24,52 ±0,05	23,67 ±0,17	24,26 ±0,06	23,14 ±0,02	32,37 ±1,56	29,51 ±1,20	24,84 ±0,22	>34	31,44 ±1,11	>34	26,03 ±0,27	25,79 ±0,26	33,6 ±1,10	26,5 ±1,01	

в нормальных тканях, т.е. в большинстве изученных образцов сайт GCGT в промоторе гена *ESR1* более метилирован в опухолевых тканях, чем в здоровых.

Результаты GLAD-ПЦР анализа сайта GCGC в первом экзоне гена *ELMO1* показывают (рис. 2), что для здоровых тканей полученные значения Cq близки к 30 или больше этой величины, что соответствует отсутствию метилирования этого сайта. Схожие величины Cq были получены для шести препаратов опухолевых тканей 1Т, 2Т, 19Т, 20Т, 25Т и 50Т. В то же время, для остальных девяти опухолевых тканей Cq варьирует от 23,14 до 27,21, что соответствует заметному метилированию изучаемого сайта GCGC в препаратах ДНК.

Существенное метилирование указанных сайтов в обоих генах наблюдается в опухолевых тканях шести образцов под номерами 16, 37, 54, 59, 75 и 76. Значительное метилирование одного из генов наблюдается еще в шести образцах опухолевых тканей под номерами 1, 2, 31, 50, 51, 56 (рис. 2). Эти 12 образцов представляют все четыре стадии заболевания, что соответствует данным литературы о статусе метилировании регуляторных областей генов-онкосупрессоров при развитии и прогрессировании опухоли [2,6].

Перспективы применения GLAD-ПЦР анализа для диагностики

Полученные результаты показывают, что GLAD-ПЦР анализ позволяет выявить сайты R(5mC)GY, возникающие при aberrантном метилировании регуляторных областей генов-онкосупрессоров в опухолевых тканях и клеточной линии SW837. Сайт GCGT в промоторе гена *ESR1* слабо метилирован в здоровых тканях, однако в большинстве опухолевых тканей наблюдается увеличение его метилирования. Сайт GCGC в первом экзоне гена *ELMO1* неметилирован в здоровых тканях и метилирован в 60% образцов опухолевых тканей.

В настоящее время существуют методы определения aberrантно метилированной внеклеточной ДНК в крови пациентов на основе бисульфитной конверсии ДНК [10, 14]. Однако, эти методы трудоемки и часто дают ошибочные результаты, в связи с чем они практически не используются. Применение GLAD-ПЦР анализа позволяет определить наличие aberrантно метилированной внеклеточной ДНК существенно более простым и надежным методом, заключающимся, по сути, в последовательной обработке ДНК двумя ферментами и проведении последующей ПЦР в режиме

реального времени. В дальнейшем планируется продолжить работу с образцами тканей для выявления сайтов aberrантного метилирования, пригодных для GLAD-ПЦР анализа, в регуляторных районах других генов-онкосупрессоров. Из набора проверенных сайтов будут отобраны те из них, метилирование которых наблюдается в наибольшем количестве образцов опухолевых тканей при условии отсутствия их метилирования в здоровых тканях. Сформировав панель таких сайтов, можно будет перейти к GLAD-ПЦР анализу препаратов внеклеточной ДНК из крови пациентов с целью разработки относительно простого и доступного метода лабораторной диагностики колоректального рака.

По результатам работ оформлен патент «Способ определения метилирования сайтов PuCGPy регуляторных областей генов-онкомаркеров колоректального рака методом GLAD-ПЦР-анализа и олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для осуществления указанного способа», приоритет от 16.07.15 N 2015129314.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению № 14.604.21.0102 от 05.08.2014 г. (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0102), заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдурашитов М.А., Чернухин В.А., Томилов В.Н. и др. Рестрикционный анализ ДНК человека – новые возможности в ДНК-диагностике // Мед. генетика. 2007. – Т. 6. – № 8. – С. 29-36.
2. Киселева Н.П., Лихтенштейн А.В. В кн.: Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. М., – 2004.
3. Кузнецов В.В., Акишев А.Г., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Способ определения нуклеотидной последовательности Pu(5mC)Py в заданном положении протяженной ДНК // Патент РФ № 2525710. – 2013.
4. Смит К., Кло С., Кантор Ч. Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвиса. М., – 1990.
5. Caiazza F., Ryan E.J., Doherty G. et al. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis // Front. Oncol. – 2015. – Vol. 5. – P. 19.
6. de Caseres I.I., Cairns P. Methylated DNA sequences for early cancer detection, molecular classification and chemotherapy response prediction // Clin. Transl. Oncol. – 2007. – Vol. 9. – N 7. – P. 429-437.
7. Handa V., Jeltsch A. Profound sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // J. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 348. – N 5. – P. 1103-1112.
8. Kibriya M.G., Raza M., Jasmine F. et al. A genome-wide DNA methylation study in colorectal carcinoma // BMC Med. Genomics. – 2011. – Vol. 4. – P. 50.

9. LaPointe L.C., Pedersen S.K., Dunne R. et al. Discovery and validation of molecular biomarkers for colorectal adenomas and cancer with application to blood testing // PLoS One. – 2012. – Vol. 7:e29059.
10. Lao V.V., Grady W.M. Epigenetics and colorectal cancer // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2011. – Vol. 8. – P. 686-700.
11. Mishra D.K., Chen Z., Wu Y. et al. Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells // Mol. Cancer Ther. – 2010. – Vol. 9. – N 1. – P. 33-45.
12. Mitchell S.M., Ross J.P., Drew H.R. et al. A panel of genes methylated with high frequency in colorectal cancer // BMC Cancer. – 2014. – Vol. 14. – P. 54.
13. Tarasova G. V., Nayakshina T.N., Degtyarev S. Kh. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal // BMC Mol. Biol. – 2008. – Vol. 9:7.
14. Umer M., Herceg Z. Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods // Antioxid. Redox. Signal. – 2013. – Vol. 18. – P. 1972-1986.
15. Yagi K., Akagi K., Hayashi H. et al. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer // Clin. Cancer Res. – 2010. – Vol. 16. – N 1. – P. 21-33.

Поступила в редакцию 17.09.2015 г.

A.A.Evdokimov¹, N.A.Netesova¹, N.A.Smetannikova¹, M.A.Abdurashitov¹, A.G.Akishev¹, E.S.Davydovich¹, Yu.D.Ermolaev², A.B.Karpov², A.E.Sazonov², R.M.Takhauov², S.Kh.Degtyarev¹

Application of GLAD-PCR analysis for the methylation sites detection in the regulatory areas of tumor-suppressor genes ELMO1 and ESR1 in colorectal cancer

¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"

²Seversk Biophysical Research Centre Tomsk region

Aberrant methylation of regulation regions of tumor-suppressor genes is showed for many cancer diseases. In course of this modification an enzyme DNMT3 methylates RCGY sites in CpG-islands of regulation regions producing R(5mC)GY sites. Earlier we developed GLAD-PCR assay to determine R(5mC)GY site in a definite position of human genome. In this work we have applied GLAD-PCR assay to determine R(5mC)GY sites in regulation regions of ESR1 and ELMO1 tumor-suppressor genes. We have studied a fragment of first exon of ELMO1 gene and a part of ESR1 promoter region in DNA preparations from malignant cell line SW837 and colorectal tumor samples. We have checked four sites in each region and found two highly methylated sites: GCGC in first exon of ELMO1 gene and GCGT in promoter region of ESR1 gene. Site GCGT is weakly methylated in healthy tissues and more methylated in the most of colorectal samples. Site GCGC is not methylated in healthy tissues and significantly methylated in 60% of colorectal samples. A possibility to use GLAD-PCR assay for cancer diagnostics is discussed.

Key words: DNA methylation, tumor-suppressor genes, colorectal cancer, PCR