

*К.А. Бабалян², Р.Султанов², Е.В. Генерозов¹, Н.Б. Захаржевская¹, Е.И. Шарова¹,
М.Н. Пешков¹, А.О. Васильев³, А.В. Говоров³, Д.Ю. Пушкарь³, Е.А. Прилепская³,
С.А. Даниленко¹, Е.А. Бабикова², А.К. Ларин¹, В.М. Говорун^{1,2}*

Полногеномный анализ метилирования ДНК при раке предстательной железы с использованием технологии Infinium Humanmethylation450 Beadchip

¹ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва

²Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

³ ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва

С использованием технологии ДНК чипов Infinium HumanMethylation450 BeadChips был проанализирован количественный статус метилирования ДНК в 12 парных образцах аденокарциномы предстательной железы и морфологически неизменной ткани. Анализ дифференциально метилированных регионов генома показал ассоциацию с патологическим статусом для 21610 гиперметилированных и 3852 гипометилированных CpG сайтов. Доминирование в опухолевом геноме гиперметилированных сайтов и их преимущественная локализация в регуляторных областях генов свидетельствуют об их вероятной роли в реализации механизмов генной супрессии в патогенезе рака предстательной железы (РПЖ). Для 14 генов в исследованном массиве были охарактеризованы максимальные показатели гиперметилирования в промоторной области (>50% CpG сайтов) в сочетании с высокими различиями в уровне метилирования между клиническими группами (>40%). Роль гиперметилирования в некоторых из них: AOX1, KLF8, ZNF154, TMEM106A в патогенезе РПЖ уже была показана ранее. Для оценки диагностического потенциала эпигенетических маркеров РПЖ была проведена непредвзятая селекция отдельных CpG сайтов, наиболее достоверно дискриминирующих опухолевые образцы от группы неопухолевых образцов. В отобранную диагностическую модель, основанную на логистической регрессии, вошло 9 CpG сайтов. Валидация модели была осуществлена на независимом массиве данных по метилированию 40 парных образцов РПЖ из проекта Атлас Ракового Генома (TCGA), проанализированных на такой же версии ДНК чипа. Полученные после валидации суммарные показатели диагностической информативности модели (специфичность 95%, чувствительность 97%, площадь под характе-

ристической кривой диагностического теста (ROC) – 0,96) позволяют рассматривать эти CpG сайты в качестве потенциальных маркеров для молекулярной диагностики РПЖ.

Ключевые слова: рак предстательной железы, метилирование ДНК, диагностика

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний среди мужчин. В России ежегодно заболеваемость растет в среднем на 8,7%, а суммарный прирост заболеваемости за десятилетний период с 1996 по 2006 г. (129,4%) опережает рост заболеваемости всеми другими видами рака [1,3]. Как и большинство онкологических заболеваний, РПЖ на ранних стадиях характеризуется бессимптомным течением, что существенно осложняет его своевременную диагностику [2]. Однако результаты научных исследований, проведенных в последнее десятилетие, позволили существенно улучшить понимание молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания. Охарактеризованы изменения в уровне образования факторов роста и их рецепторов, активации сигнальных каскадов, ассоциированных с андрогеновыми рецепторами и рецепторами эстрогенов. Появилось большое количество экспериментальных данных, раскрывающих роль генетических (мутации) и эпигенетических факторов в патогенезе РПЖ, что позволяет рассматривать некоторые из них в качестве кандидатных маркеров для ранней диагностики [27].

Из эпигенетических изменений, ассоциированных с РПЖ, особая роль отводится aberrantному метилированию ДНК. Инактивация за счет гиперметилирования ДНК в промоторных регионах как механизм потери функциональной активности показана для некоторых генов репарации ДНК, клеточной дифференцировки, и в совокупности с генетическими му-

тациями это может создавать благоприятный фон для возникновения множества ассоциированных с опухолевым ростом других молекулярно-генетических нарушений. Уже охарактеризован ряд генов, метилирование которых связывают с развитием РПЖ. Так, изменение профиля метилирования промоторной области гена глутатионтрансферазы S (GSTP1), вовлеченного в регуляцию апоптоза и утилизацию ксенобиотиков, является одним из наиболее широко описанных проявлений эпигенетических аномалий в опухолевых клетках (в том числе, предстательной железы) [22]. Гиперметилирование промоторных областей при РПЖ было показано для генов APC, RASSF1, генов рецептора андрогенов (AR), рецептора эстрогенов (Erg, ERb), антигена CD44, цитохрома P4501A1 (CYP1A1) и др. [37]. Тем не менее, далеко не все эпигенетические изменения можно рассматривать как функционально значимые в контексте патогенеза онкологического заболевания. Многие из них могут являться уже следствием других масштабных молекулярно-генетических изменений, ассоциированных со стремительным развитием опухолевых клеток.

Возможности комплексного и непредвзятого анализа эпигенетических событий, происходящих в ходе развития злокачественной опухоли, до недавнего времени были ограничены на методическом уровне. Большинство известных на сегодняшний день данных о роли метилирования ДНК в РПЖ было получено с использованием ген-ориентированного подхода, основанного на анализе ограниченного числа кандидатных генов. В течение нескольких последних лет арсенал методов исследования существенно пополнился. Для анализа метилирования ДНК стали применяться технологии секвенирования нового поколения, технологии ДНК-чипов, позволяющие получать данные о статусе метилирования на полногеномном уровне.

Все большее распространение получает использование адаптированных для исследования статуса метилирования ДНК-чипов. Основным преимуществом такого подхода является возможность одновременного анализа большого количества заранее predeterminedных CpG сайтов в геномной ДНК. Так, ДНК-чип «Infinium HumanMethylation450 BeadChip» от компании «Illumina» (США) – это фактически полногеномный вариант исследования, так как он анализирует 98,9% от всех охарактеризованных генов (по базе данных UCSC RefGenes) со средним покрытием на ген в 17,2 зондов. Постановка исследования с использованием метильных ДНК-чипов хорошо автоматизируется, данные получаемые на чипах одной и

той же версии легко сравнивать и анализировать, они хорошо воспроизводимы. Указанный ДНК чип выбран в качестве стандарта для исследовании метилирования ДНК в различных группах онкологических заболеваний, в том числе и РПЖ, в рамках международного проекта «Атлас ракового генома» (TCGA - The Cancer Genome Atlas). К настоящему времени уже опубликованы результаты нескольких исследований по раку предстательной железы, выполненные с использованием чипа Infinium HumanMethylation450 BeadChip. В последнем из них был проанализирован статус метилирования 20 парных образцов опухолевой и патологически неизменной ткани, полученных в ходе тотальной простатэктомии [18]. В двух других было проанализировано выборки из 19 не парных образцов РПЖ и 4 образцов нормальной ткани [23], а в исследовании J.M. Devaneu и соавт., было проанализировано 6 парных образцов [12]. В этих исследованиях удалось выявить значительное количество дифференциально метилированных CpG сайтов. Однако, полученные результаты еще не были проверены в независимых исследованиях. Корректное сравнение данных не всегда возможно и из-за различий в стратегии отбора клинических образцов для анализа (наличие/отсутствие в анализе образца нормы), различий этнического характера и других клинических особенностей исследуемых групп.

Целью данного исследования является количественный анализ профиля метилирования ДНК с использованием технологии Infinium HumanMethylation450 BeadChip (HM450) на выборке из гистологически верифицированных парных образцов аденокарциномы предстательной железы и неопухолевой ткани для характеристики возможных патогенетических механизмов развития РПЖ, обусловленных эпигенетическими изменениями, а так же подтверждения ранее выявленных и поиска новых эпигенетических маркеров заболевания.

Материалы и методы

Клиническая группа. Исследование проводилось на базе ГКБ № 50 ДЗ г. Москвы. В исследование было включено 12 пациентов после радикальной простатэктомии с гистологически верифицированной ацинарной аденокарциномой, ранее не лечившихся по поводу РПЖ и давших информированное согласие на участие. Средний возраст пациентов на момент забора образцов составлял 61 г. в диапазоне от 49 до 74 лет. У всех пациентов отмечалась перинеуральная инвазия, у 1 из 5 пациентов с экстрапростатической инвазией дополнительно была отмечена инвазия в семенные пузырьки.

Выделение ДНК из парафиновых срезов. Для анализа профиля метилирования использовалась ДНК парафинизированных послеоперационных образцов тканей простаты,

при этом отдельно выделялась ДНК из опухолевых и неопухолевых участков ткани одного и того же пациента. Таким образом, из образцов ткани простаты 12 больных было выделено 12 образцов ДНК опухолевой ткани и 12 образцов ДНК неопухолевой ткани. Депарафинизация проводилась ксилолом, выделение ДНК из парафинизированных тканей проводилось с использованием набора AllPrep DNA/RNA FFPE (Qiagen).

Анализ метилирования на чипе HM450. Образцы ДНК, выделенные из опухолевой и неопухолевой тканей предстательной железы были бисульфит-конвертированы с использованием набора EZ DNA Methylation gold (ZymoResearch) согласно инструкции производителя. Исследование статуса метилирования было, как отмечалось, произведено с использованием технологии Infinium Human Methylation450 (HM450) Bead Chiparray (Illumina, Inc.) согласно инструкции производителя. Парные образцы были представлены в пределах одного чипа. Анализ для всех образцов был проведен одновременно.

Контроль качества и препроцессинг. Контроль качества и препроцессинг данных полученных при использовании чипа HM450, проводился при помощи программного обеспечения RnBeads v0.99 [47]. Фильтрация корректно идентифицированных CpG сайтов производилась с использованием алгоритма GreedyCut со следующими показателями: $p > 0.05$, покрытие $< 95\%$. В качестве меры метилирования использовалась количественная величина

$$\beta = \frac{I_{\text{met}}}{I_{\text{met}} + I_{\text{nonmet}}}, \text{ где } I_{\text{met}} - \text{интенсивность сигнала от зонда, идентифицирующего определенный метилированный CpG сайт, а } I_{\text{nonmet}} - \text{интенсивность от зонда, идентифицирующего этот же CpG сайт в случае его неметилированного статуса. Таким образом, диапазон значений } \beta \text{ меняется от 0 до 1, где } \beta = 0 \text{ говорит об отсутствии метилирования в исследуемом сайте, а } \beta = 1 - \text{о его полном метилировании. Фоновая коррекция и нормализация данных производилась с использованием алгоритмов NOOB [14] и BMIQ [37].}$$

Анализ дифференциально метилированных регионов. Для выявления дифференциально метилированных CpG сайтов использовался алгоритм Limma [35] со следующими критериями: разница между средними значениями β в группе образцов с опухолевой тканью (ОТ) и неопухолевой тканью (не ОТ) ($\Delta\beta = \beta_{\text{ОТ}} - \beta_{\text{неОТ}}$) по абсолютному значению > 0.2 при $p < 0.01$ с поправкой на множественное сравнение по критерию FDR (False Discovery Rate). Для определения более протяженных дифференциально метилированных регионов, включающих множество CpG сайтов использовался такой же подход с предварительным усреднением показателей метилирования по CpG сайтам, входящим в анализируемый регион. Функциональная аннотация дифференциально метилированных регионов и анализ обогащения категорий базы данных Gene Ontology (GO) проводились с помощью программного пакета R GOStats [14] и онлайн сервиса REVIGO [37].

Отбор кандидатных диагностических маркеров. Для выявления CpG сайтов, наиболее достоверно отличающих по статусу метилирования ДНК опухолевых и неопухолевых образцов использовали алгоритм LASSO, реализованный в программном пакете Glmnet 2.0-2 [21]. Обучение модели на основе логистической регрессии было выполнено на экспериментально полученных данных по дифференциально метилированным CpG сайтам. Валидация модели производилась на открытых данных, полученных при исследовании метилирования ДНК в образцах РПЖ с использованием такого же типа чипов и предоставленных нам консорциумом «The Cancer Genome Atlas» (TCGA) [49]. Специфичность, чувствительность модели и данные для создания характеристической кривой диагностического теста – ROC рассчитывали при помощи пакета R pROC [45].

Результаты и обсуждение

Общая характеристика вариабельности метилирования. В ходе препроцессинга полученных данных из начального набора CpG сайтов для дальнейших расчетов были удалены значения по CpG сайтам, не удовлетворяющие аналитическим критериям качества данных. В результате, для дальнейших расчетов использовался выравненный массив, в котором в каждом из образцов присутствует информация по метилированию 457123 CpG сайтов. Из группового сравнения был исключен целиком один из образцов нормы, в котором количество некорректно идентифицированных значений превысило установленный порог.

Для общей оценки биологической значимости метилирования в исследованном массиве данных были использованы методы кластеризации на основе всех 457123 полученных β -значений с использованием метода главных компонент (PCA) и корреляционного анализа по Спирмену. Как следует из визуализации результатов PCA-анализа (рис. 1А), образцы, соответствующие опухолевой и неопухолевой ткани группируются в два различных кластера. При этом образцы, относящиеся к неопухолевой ткани, группируются в более компактный и четко отделяемый кластер. Суммарно, первые две компоненты выполненного PCA теста объясняют около 43% вариабельности между образцами патологии и нормы. Это соответствует опубликованным ранее наблюдениям о меньшей вариабельности показателей метилирования в неопухолевых тканях и, наоборот, большему разбросу данных в опухолевых образцах [39]. Аналогичные выводы можно сделать из результатов анализа попарной корреляции по Спирмену, выполненной между всеми возможными парами в исследуемых образцах. Рассчитанные коэффициенты корреляции (от 0,85 до 1) отражают схожесть образцов по характеру метилирования всех CpG сайтов. Визуализация корреляционного анализа по Спирмену приведена на рис. 1Б. В итоге, наиболее общий анализ, учитывающий эпигенетическую вариативность всех полученных данных, свидетельствует о том, что различия в метилировании ДНК достоверно ассоциированы с патологическим статусом образца.

Анализ дифференциально метилированных регионов. Для анализа дифференциально метилированных (ДМ) регионов сравнивали средние значения метилирования для каждого CpG сайта между группами ОТ и не ОТ по алгоритму LIMMA с дополнительными критериями. По результатам анализа поставленным условиям удовлетворило 25262 CpG сайта. Из них в группе опухолевых образцов 21610 CpG сайтов, лока-

лизированных в 4614 генах, были гиперметилированными, а 3852 CpG сайта (1946 генов) были гипометилированными по отношению к таким же участкам в группе неопухолевых образцов. При этом, по крайней мере, 508 генов имели смешанный характер метилирования. То есть, различные их участки были представлены как гипо-, так и гиперметилированными сайтами. В большинстве случаев, у таких генов наблюдались отличия в профиле метилирования между промоторной областью (гиперметилирование) по сравнению с телом гена и 3'-нетранслируемой областью (гипометилирование). Среди генов с таким характером распределения метилирования были CDH13 (cadherin 13), кодирующий один из белков клеточной адгезии, и MTSS1 (Metastasis Suppressor 1), ответственный за супрессию метастазирования, а так же другие гены.

Выявленное при анализе опухолевых образцов соотношение гипер- и гипометилирования соответствует опубликованным недавно данным, основанным на полногеномном анализе метилирования в РПЖ. Так, преобладание гиперметилирования ДНК в патологических образцах РПЖ было показано как в работах, выполненных с использованием ДНК чипов, так и основанных на методе секвенирования бисульфит конвертированной ДНК [4, 28].

Геномное распределение и функциональная аннотация дифференциально метилированных CpG сайтов. Для того, чтобы охарактеризовать потенциальную функциональную роль масштабных и разнонаправленных эпигенетических различий, выявленных в исследуемых группах, проанализировали распределение ДМ CpG сайтов по их расположению в отношении к различным структурным элементам гена. Для них использовали 6 участков: регионы TSS1500 и TSS200 (по кол-ву нуклеотидов от сайта старта транскрипции), 5'-UTR – 5' нетранслируемая область; 1stExon – 1й экзон; Gene body – тело гена; и 3'-UTR – 3' – нетранслируемый регион. Позиционирование конкретного CpG сайта на данные категории (участки) выполнялось в соответствии с их локализацией, приведенной в аннотационном файле к ДНК чипу. После этого, для корректного сравнения была выполнена нормализация на количество всех CpG сайтов, представленных в этой категории на чипе. Результаты показали, что гиперметилированные CpG сайты были в большей степени, чем гипометилированные, представлены в промоторных областях генов (TSS200, 5'-UTR, 1stExon). И, наоборот, доля гипометилированных CpG сайтов была существенно больше в категории 3'-UTR, теле гена и межгенных областях (рис 2А).

По аналогичной схеме было рассчитано распределение ДМ сайтов в отношении их

удаленности от CpG островков по следующим категориям: CpG Island – CpG островок, NShore, SShore – северный и южный «CpG-шоры» (удаление от CpG островка на 2000 нт.), NShelf, SShelf – северный и южный «CpG шельфы» (удаление от CpG островка на 4000 нт.) и категория «OpenSea» (открытое море) – одиночные CpG сайты вне контекста «островной» классификации. Как следует из диаграммы (рис. 2Б), гиперметилированные CpG сайты в 15 раз чаще были локализованы в составе CpG островков (26,8%), чем гипометилированные CpG (1,8%). И, наоборот, значимые различия по гипометилированию преобладали в областях, удаленных от CpG островков (рис. 2Б).

На следующем этапе была проведена функциональная аннотация идентифицированных ДМ сайтов подходом, основанным на методе обогащения генных сетей с использованием баз данных генной онтологии (Gene Ontology (GO)) по классификаторам «Биологический процесс» (Biological Process) и «Молекулярная функция» (Molecular Function). Такой анализ позволяет выяснить, являются ли полученные нами в ходе предыдущего анализа списки генов с дифференциально метилированными CpG сайтами, случайными наборами с точки зрения биологических процессов, в которых задействованы эти гены. При помощи онлайн инструмента – REVIGO (Reduce and Visualize Gene Ontology) избыточные ГО-термины были удалены из списка обогащения, а оставшиеся сходные термины объединены в еще более крупные функционально-смысловые кластеры, что упрощает их интерпретацию [37]. Так как гиперметилированных генов в наших данных было выявлено существенно больше, то особый интерес представлял анализ достоверно преобладающих функций, ассоциированных именно с этой категорией эпигенетических отличий. 10 статистически наиболее обогащенных категорий по классификации «Биологические процессы» и «Молекулярные функции» представлены в табл. 1.

Согласно данным анализа по классификатору «Биологические процессы, в наибольшей степени были представлены категории, ассоциированные с сайленсингом хроматина, сборкой нуклеосом, деметилированием гистонов, собственно метилированием ДНК, регуляцией транскрипции, клеточной дифференцировкой и другие. Роль генов, представляющих эти категории в патогенезе онкологических заболеваний, в том числе и аденокарциномы предстательной железы, была охарактеризована как в исследованиях по их экспрессии, так и метилирования ДНК [19,36]. Классификатор «Молекулярные функции» был также обогащен категориями, нарушения в которых, часто ассоциированы со

злокачественной трансформацией: гены деметилазной активности, деметилаз гистонов, гетеродимеризации белков, связывания с ДНК и др. (табл. 1). Роль глобального изменения метилирования гистонов, в частности H4-K20, была недавно показана для аденокарциномы предстательной железы в экспериментах на тканевых матрицах (tissue microarray) с использованием соответствующих антител [6,13]. Выявленное обогащение по генам, входящим в категорию GO:0035575 (Деметилазная активность гистона (H4-K20)), свидетельствует о возможном механизме регуляции этого процесса и на уровне aberrантного метилирования CpG сайтов.

Анализ обогащения генных сетей гипометилированными генами показал, что как по классификатору «Биологические Процессы», так и по классификатору «Молекулярные функции» были наиболее обогащены категории, связанные с клеточным сигналингом, в частности, сопряжённые с G-белком с кератинизацией клеток и механизмами детекции химических компонентов, реализуемыми в обонятельных рецепторах. Если для генов, участвующих в клеточном сигналинге, кератинизации и из других обогащенных категорий, роль в онкологических процессах выглядит очевидной, то обнаружение в списках категорий, относящихся к системе обоняния, может показаться необычной. Тем не менее, анализ публикаций показал, что эта находка тоже, скорее всего, не случайна. Так, исследования по профилированию экспрессии обонятельных генов показали, что они активны не только в обонятельном эпителии, но и в других тканях, в том числе и в семенных железах и сперматозоидах [15]. Более того, активация некоторых из обонятельных рецепторов в модельных экспериментах ингибирует пролиферацию клеток аденокарциномы предстательной железы [30]. На сегодняшний день пока нет доказанных данных о возможной роли метилирования генов обонятельных рецепторов в патогенезе рака предстательной железы, но выявленные отличия в профилях метилирования, полученные в представленном материале, говорят о том, что в этом может быть определенный смысл.

В целом, анализ обогащения генных сетей показал, что выявленные гены с дифференциально метилированными регионами не случайно в большей степени представлены в функциональных категориях, часто измененных как при раке предстательной железы, так и при других онкологических заболеваниях, что свидетельствует о биологическом значении найденных эпигенетических отличий. В свою очередь, доминирование случаев гиперметилирования, в особенности в промоторных регионах генов, в составе CpG островков, говорит о вероятном преобладании

механизмов генной супрессии, ассоциированных с метилированием в ходе развития РПЖ. В то же время, случаи гипометилирования в большей степени выявляются в нетранслируемых регионах генов, в межгенных последовательностях и в отдаленных от CpG островков участках генома. Этот факт и то, что гипометилированных сайтов в опухолевых образцах было выявлено гораздо меньше, может указывать на их второстепенную роль в патогенезе заболевания и/или расцениваться как на отражение общей геномной нестабильности.

Характеристика генов с наибольшими отличиями уровня метилирования в промоторной области. Далее, для более детальной характеристики были отобраны гены с максимальными показателями гиперметилирования в промоторной области в сочетании с высокими различиями в уровне метилирования между клиническими группами. Для этого из исходной группы в 21610 гиперметилированных CpG сайтов были отобраны только те, которые попадают в зоны TSS1500, TSS200, 5'UTR и 1-й экзон, то есть в промоторные области генов. На следующем этапе из этой группы были отобраны только те гены, в которых гиперметилирование в промоторной области было характерно более чем для 50% CpG сайтов. В качестве последнего фильтра были отобраны только те гены, в которых суммарная разница между метилированием промоторной области между группой ОТ и не ОТ превышала 40% ($\Delta\beta > 0,4$). Таким образом, был сформирован список из 14 генов, удовлетворяющих одновременно двум параметрам: максимально выраженным наибольшим отличием уровня метилирования и максимально схожим характером метилирования в промоторной области (табл. 2).

Анализ опубликованных на сегодняшний день данных показал, что большая часть генов из этого списка часто оказываются гиперметилированными при разных онкологических заболеваниях. Для некоторых из них связь гиперметилирования со снижением экспрессионной активности уже экспериментально доказана. Наиболее выраженным гиперметилирование промоторного региона в опухолевых образцах было характерно для гена AOX1. Этот ген кодирует альдегид-оксидазу 1 типа, участвующую в метаболизме ксенобиотиков. Гиперметилирование промоторной зоны AOX1 было уже показано в серии исследований, посвященных анализу метилирования ДНК при РПЖ [8,16,23,29]. В том числе, была показана и ассоциация гиперметилирования CpG сайтов промоторной зоны гена с пониженным уровнем экспрессии мРНК.

Данные о связи гиперметилирования с функциональной активностью рецептора, кодиру-

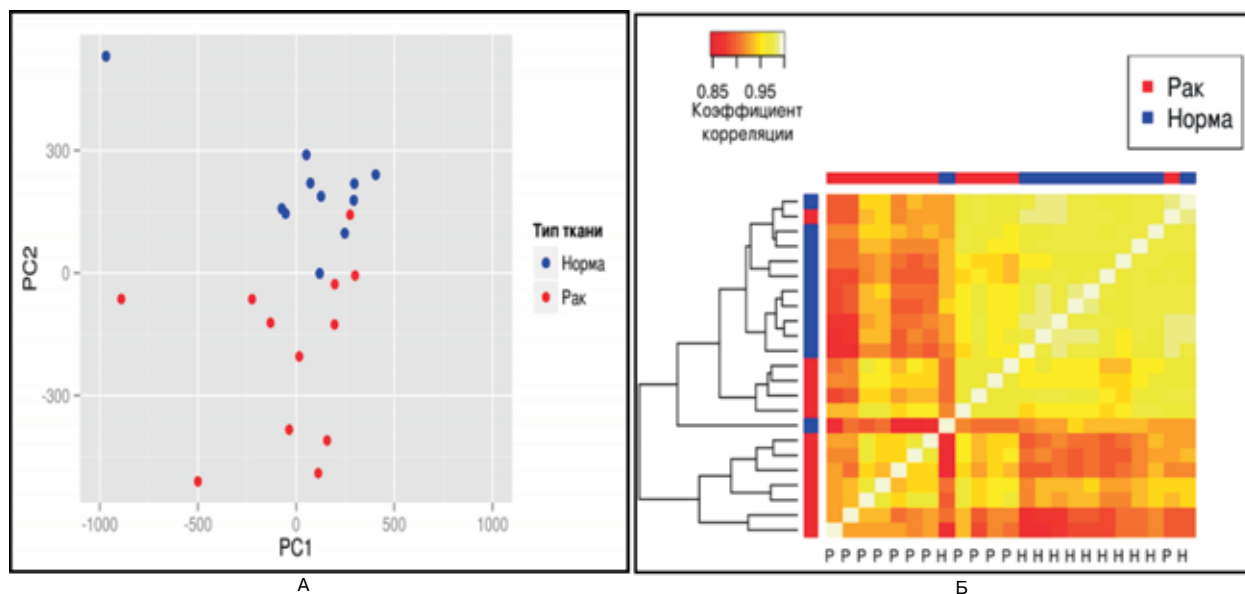


Рисунок 1. Вариабельность данных метилирования.

А. График кластеризации исследованной выборки образцов на основе данных по метилированию 457123 CpG сайтов, построенный с использованием метода главных компонент (PCA). Красными точками обозначены образцы опухолевой ткани предстательной железы, синими – образцы соответствующей неопухолевой ткани. Б. Визуализация в виде тепловой карты корреляционного анализа по Спирмену между всеми парами образцов нормальной ткани и РПЖ. Отмечается значительная корреляция между образцами неопухолевой ткани и большая гетерогенность в группе образцов опухолевой ткани

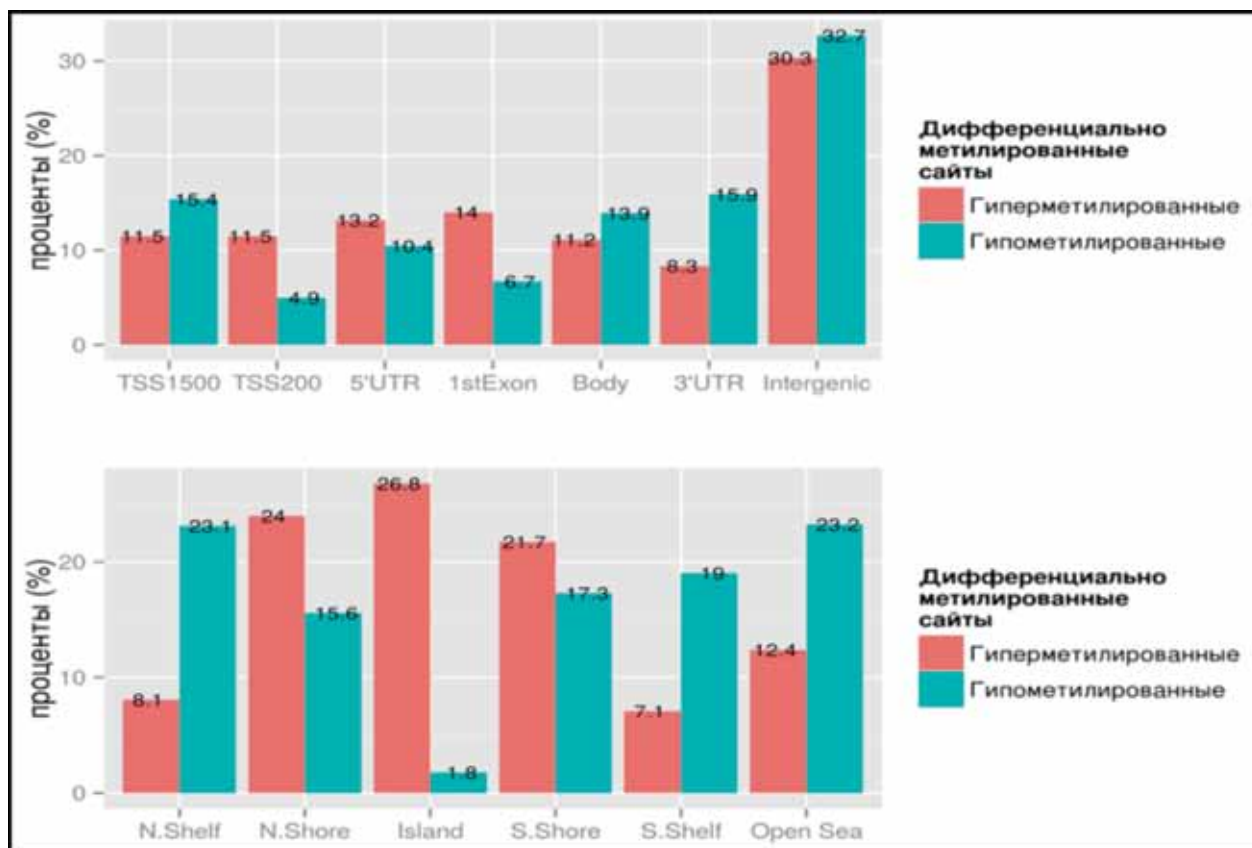


Рисунок 2. Гистограмма нормализованного распределения гипер и гипометилированных CpG сайтов в геноме.

Данные по количеству сайтов представлены в процентах и нормализованы на их общее количество в соответствующей категории, представленной на чипе. А. Распределение ДМ CpG сайтов по отношению к структурным элементам гена: TSS1500, TSS200 (количество нуклеотидов от сайта старта транскрипции); 5'-UTR – 5' нетранслируемая область; 1stExon – 1й экзон; Genebody – тело гена; и 3'-UTR – 3' – нетранслируемый регион. Б. Распределение ДМ CpG сайтов по отношению к CpG островам: CpGIsland – CpG островок; NShore, SShore – северный и южный «CpG-шоры» (удаление от CpGостровка на 2000 нт.); NShelf, SShelf – северный и южный «CpG шельфы» (удаление от CpGостровка на 4000 нт.); «OpenSea» (открытое море) – одиночные CpGсайты вне контекста «островной» классификации.

Таблица 1.
Наиболее обогащенные категории базы данных Gene Ontology (GO) в разделах «Биологические процессы» и «Молекулярные функции», в которых локализованы гиперметилированные в опухолевой ткани гены.
(По результатам анализа с использованием метода REVIGO)

Идентификатор	Описание	Достоверность (pValue)
Категория биологических процессов		
GO:0032776	Метилирование ДНК	1.71083E-28
GO:0051290	Гетеротетрамеризация белков	3.35492E-26
GO:0000183	Репрессия транскрипции рибосомальной ДНК при изменении конформации хроматина	5.08058E-25
GO:0006335	Репликационно зависимое формирование нуклеосом	6.12935E-25
GO:0032501	Биологический процесс на уровне многоклеточного организма	2.43195E-22
GO:0007156	Клеточная адгезия посредством мембранных белков	5.04934E-22
GO:0098609	Межклеточная адгезия	1.28206E-21
GO:1902679	Негативная регуляция биосинтеза РНК	3.96554E-18
GO:0006305	ДНК алкилирование	3.61621E-17
GO:0035574	Деметилирование гистона H4-K20	8.967E-17
Категория молекулярных функций		
GO:0043565	Последовательность специфичное ДНК связывание	1.5538E-42
GO:0046982	Гетеродимеризация белка	1.0532E-18
GO:0035575	Деметилазная активность гистона (H4-K20)	5.5772E-17
GO:0000981	Транскрипционная активность РНК полимеразы II	1.2182E-13
GO:0001077	Положительная регуляция транскрипционной активности РНК полимеразы II	2.2885E-12
GO:0005509	Связывание ионов кальция	7.1686E-12
GO:0000975	Связывание регионов регуляции транскрипции	3.4164E-10
GO:0042393	Связывание гистонов	2.2281E-09
GO:0032451	Деметилазная активность	3.5227E-09
GO:0001159	Связывание промоторной зоны ДНК	4.9045E-09

Таблица 2.
Ранжированный список генов с гиперметилированным промоторным регионом в образцах опухолевой ткани предстательной железы в сравнении с соответствующей неопухолевой тканью

Ген	Кол-во CpG в промоторной области (доля гипермет. %)	Средние показатели метилирования промотора в группе (β)		Среднее различие метилирования «ОТ- не ОТ» (Δβ)	Достоверность отличий	
		ОТ*	не ОТ		Pvalue	CombRank
AOX1	10 (100%)	0.55	0.07	0.48	5.16E-06	4
TUBA4B	7 (100%)	0.52	0.09	0.44	4.74E-07	8
NKX2-6	11 (100%)	0.53	0.10	0.42	6.23E-06	9
ACSS3	13 (100%)	0.54	0.10	0.44	1.98E-05	14
ZSCAN12	10 (100%)	0.59	0.13	0.46	5.16E-06	14
ZNF154	9 (100%)	0.67	0.14	0.53	4.74E-07	18
ARX	12 (92%)	0.61	0.20	0.41	5.50E-05	36
TMEM106A	10 (100%)	0.64	0.15	0.49	1.11E-05	39
GPRASP1	12 (83%)	0.53	0.13	0.40	6.22E-05	42
TAC1	11 (91%)	0.65	0.22	0.44	9.65E-06	60
CYBA	13 (92%)	0.71	0.24	0.47	3.84E-06	81
KLF8	13 (85%)	0.66	0.24	0.42	2.33E-05	96
EPSTI1	13 (85%)	0.60	0.18	0.42	5.88E-04	177
RHCG	9 (89%)	0.64	0.23	0.41	1.11E-05	220

* ОТ – опухолевая ткань, не ОТ – неопухолевая ткань

Таблица 3.
Дифференциально метилированные CpG сайты, отобранные в качестве кандидатных маркеров для диагностической панели

CpG сайт	Локализация сайта				Средние показатели метилирования +/- (ст. откл)		Среднее различие метилирования «ОТ-не ОТ» ($\Delta\beta$)	Диагностическая информативность		
	Хромо-сома	Ген	Регион гена	CpG островок	ОТ*	не ОТ		Специ-фичность	Чувстви-тельность	Площадь под ROC кривой**
cg23230584	7	PON3	TSS200	Island	0.59+-0,16	0.05+-0,03	0.54	0.97	0.91	0.96
cg07121856	7	PON3	TSS200	Island	0.57+-0,12	0.07+-0,06	0.50	0.91	0.95	0.96
cg09064304	4	-	-	Island	0.71+-0,08	0.10+-0,12	0.61	0.97	0.77	0.92
cg11306441	12	LOC400043	Body	S_Shore	0.59+-0,19	0.09+-0,04	0.50	0.73	0.90	0.92
cg01231108	2	KCNJ3	Body	Island	0.52+-0,14	0.08+-0,03	0.44	1.00	0.80	0.95
cg23189410	3	ZIC4	TSS1500	N_Shore	0.68+-0,16	0.23+-0,07	0.45	0.88	0.67	0.83
cg09333221	7	-	-	-	0.63+-0,13	0.22+-0,08	0.42	0.93	0.95	0.94
cg02724472	7	LRRC17	TSS200	-	0.65+-0,18	0.23+-0,05	0.42	0.73	0.96	0.93
cg10927449	2	-	-	Island	0.65+-0,16	0.24+-0,07	0.41	0.97	0.77	0.97
0.95 0.97 0.96								Суммарно, при одновременном анализе всех 9 CpG сайтов		

* ОТ – опухолевая ткань, не ОТ – неопухолевая ткань

** Площадь под характеристической кривой диагностического теста – ROC (Receiver Operating Characteristic).

емого геном KLF8 пока противоречивы, хотя он характеризуется как ассоциированный с РПЖ [15,17]. Продукт этого гена является ко-активатором рецептора андрогенов. Предполагается, что ген участвует в регуляции клеточного цикла и задействован в процессах опухолевой диссеминации.

Гиперметилирование, ассоциированное с РПЖ, было показано и для гена ZNF154 [6]. Известно, что ген ZNF154 кодирует белок, регулирующий процессы транскрипции, а один из его доменов ответственен за узнавание неметилированной ДНК и определяет модификации хроматина. Для некоторых типов рака было показано снижение активности данного гена вследствие гиперметилирования [9,25,33,45], что также было продемонстрировано и в нашем исследовании.

Гиперметилирование гена TMEM106A было показано в работе как по исследованию РПЖ [18], так и других онкологических заболеваний. Так, гиперметилирование промотора гена TMEM106A было выявлено при раке желудка [46]. Этот ген кодирует мембранный белок, локализованный преимущественно на митохондриях. Повышенный уровень экспрессии гена TMEM106A способствует запуску апоптоза через систему каспаз. Поэтому, потеря экспрессии белка вследствие гиперметилирования промотора может являться причиной неконтролируемого клеточного деления и иммортализации. Гиперметилирование в промоторной зоне гена TAC1 было показано при РПЖ [30] и ранее при раке легкого и толстой кишки [41,44]. Тогда как по гену ACSS3 есть данные только по значению

метилирования при нейробластоме, но не при раке простаты [11]. По роли метилирования в гене ZSCAN12 нет опубликованных сведений, но факт его гиперметилирования полностью соотносится с низким уровнем экспрессии в опухолевой ткани предстательной железы по данным портала The Human Protein Atlas [48].

Клиническая значимость метилирования в других генах: GPRASP1, NKX26, ARX, CYBA, EPSTI1, RHCG пока не изучена детально, но уже задокументирована в результатах других полногеномных исследований онкологической направленности [20,24,32].

А потенциальная роль метилирования генов TUBA4B, ZSCAN12 и ACSS3C в отношении РПЖ показана впервые в рамках настоящего исследования. Указанные гены являются основными кандидатами для экспериментальной проверки влияния гиперметилирования их промоторных регионов на уровень экспрессии. В целом, тот факт, что по большинству из охарактеризованных генов с наибольшими отличиями уровня метилирования в промоторной области опубликованы данные, свидетельствующие об их вовлеченности в патогенез онкологических заболеваний, говорит о неслучайности подобных находок и правильности использованных алгоритмов отбора.

Отбор дифференциально метилированных CpG сайтов, наиболее информативных для включения в диагностическую панель. Описанная функциональная связь эпигенетических изменений с патогенезом РПЖ и доступность современных методов анализа позволяет рассматривать анализ метилирования в некоторых ге-

нах в качестве перспективного подхода для молекулярной диагностики заболевания. Не менее актуальным является и направление, связанное с попытками установить взаимосвязь метилирования с особенностями клинической картины заболевания: метастазированием, ответом на лекарственную терапию. На относительно небольшой выборке пациентов, вошедших в данное исследование, нам не удалось выявить достоверных отличий, связывающих профиль метилирования с информативными клиническими характеристиками. Но, несмотря на большую вариабельность показателей метилирования, ассоциированных с РПЖ, нам удалось сформировать панель из отдельных CpG сайтов, подходящих под диагностические критерии. Одним из основных требований при поиске таких вариантов была хорошая воспроизводимость данных метилирования по кандидатным сайтам, минимально варьирующая в пределах исследуемых групп.

Для формирования кандидатной диагностической панели мы провели отбор участков, наиболее достоверно отличающихся и воспроизводимых по показателям метилирования, применив к изначально охарактеризованной группе из 21610 гиперметилованных CpG сайтов следующие дополнительные критерии:

а) различия между средними β значениями в группе ОТ и не ОТ по кандидатному сайту должны превышать 40% ($\Delta\beta > 0.4$); б) минимальные значения метилирования по кандидатному сайту в индивидуальных опухолевых образцах должны превышать максимальные по этому же сайту в не опухолевых образцах ($\min(\beta_{\text{ОТ}}) > \max(\beta_{\text{неОТ}})$); в) среднее значение метилирования по кандидатному сайту в группе «неопухолевая ткань» не должно превышать 25% ($\beta_{\text{неОТ}} < 25$). Таким условиям удовлетворило 183 DM CpG сайта. На следующем этапе из этой выборки при помощи алгоритма LASSO программы Glmnet была отобрана финальная группа из 9 CpG сайтов. Далее, на основе экспериментальных значений метилирования по этим сайтам была рассчитана диагностическая модель, основанная на логистической регрессии. После этого модель была успешно подтверждена с использованием независимого массива данных по метилированию 40 парных образцов «опухоль – норма» от пациентов с РПЖ, проанализированных на аналогичной версии ДНК чипа, размещенного на портале проекта Атлас Ракового Генома (TCGA). Перечень отобранных CpG сайтов, их локализация и параметры чувствительности и специфичности диагностической модели приведены в табл.3.

Как следует из табл. 3, шесть из девяти CpG сайтов, вошедших в валидированную модель, находятся в генах и локализованы, как правило, в

составе охарактеризованных CpG островков или их непосредственной близости. Выполненный нами поиск, направленный на выявление максимально воспроизводимых точечных маркеров метилирования, удобных для их последующего анализа, изначально не был ориентирован на объяснение их возможной биологической роли. Тем не менее, примечательно, что некоторые из выявленных кандидатных сайтов находятся в генах, вовлеченных по данным некоторых исследований в патогенез онкологических заболеваний. Так, возможная связь гена PON3, кодирующего параоксоназу 3, и онкологических заболеваний объясняется за счет механизмов развития оксидативного стресса в клетках и запуска апоптоза [34,43]. Ген KCNJ3 кодирует G белок калиевого канала, непосредственно задействованного в высокой пролиферативной активности опухолевых клеток; известно влияние данного гена на развитие рака легкого и молочной железы [26,38]. Гиперметилование гена ZIC4, и гена LRRC17 также было выявлено в ряде работе по изучению патогенеза некоторых онкологических заболеваний [5,31]. Возможная биологическая значимость других кандидатных маркеров, вошедших в предлагаемую панель, пока остается неясной. Тем не менее, их в первую очередь характеризует высокая воспроизводимость данных метилирования, подтвержденная на независимом экспериментальном массиве – что рассматривается как один из наиболее ценных показателей для диагностических маркеров. С развитием современных методов анализа метилирования ДНК, позволяющих оценивать количественный статус метилирования в произвольном наборе отдельных CpG сайтов, такой формат анализа при наличии клинически информативных эпигенетических маркеров будет востребован на практике.

Суммарно, в ходе проведенного исследования были подтверждены как ранее выявленные, так и охарактеризованы новые эпигенетические изменения, характерные для РПЖ и требующие дальнейших исследований. Совокупность полученных данных позволяет на более детальном уровне оценить молекулярно-генетические особенности, ассоциированные с раком предстательной железы и открывает дополнительные возможности в поиске перспективных диагностических маркеров этого заболевания.

Все данные по метилированию, полученные в ходе настоящего исследования размещены на ресурсе NCBI Gene Expression Omnibus (Series accession number GSE74013) и свободно доступны по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE74013>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглаше-

ние о предоставлении субсидии № 14.607.21.0068 от 23 сентября 2014 года), уникальный идентификатор ПНИ RMEFI60714X0068.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аполихин О.И., Сивков А.В., Бешлиев Д.А. и др. Анализ уронефрологической заболеваемости в РФ по данным официальной статистики // Эксперимент. и клин. урология. - 2010. - № 1. - С. 4-12.
2. Лопаткин Н.А., Максимов В.А., Ходырева Л.А., Давыдова Е.Н. Оптимизация ранней диагностики заболеваний предстательной железы в условиях мегаполиса // Урология. - 2009.- № 5. -С. 50-54.
3. Чиссов В.И., Русаков И.Г. Заболеваемость раком предстательной железы в Российской Федерации // Экспериментальная и клиническая урология. - 2011. - № 2-3. - С. 6-7.
4. Arai E., Chiku S., Mori T., Gotoh M. et al. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas // Carcinogenesis. - 2012. - Vol. 33. - P. 1487-1493.
5. Bapat S.A., Krishnan A., Ghanate A.D. et al. Gene expression: protein interaction systems network modeling identifies transformation associated molecules and pathways in ovarian cancer // Cancer Res. - 2010. - Vol. 70 (12). - P. 4809-4819.
6. Behbahani T.E., Kahl P., von der Gathen J. et al. Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis // BMC Urol. - 2012. - Vol. 13. - P. 12-15.
7. Belinsky S.A., Baylin S.B., Herman J.G., Brock M.V. Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for the diagnosis of lung cancer // Clin Cancer Res. - 2014. - Vol. 20. - P. 1856-1864.
8. Borno S.T., Fischer A., Kerick M. et al. Schweiger MR. Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation // Cancer Discov 2012. - Vol. 2. - P. 1024-1035.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers // Nature. - 2012. - Vol. 489. - P. 519-525.
10. Davis, S., Du P., Bilke, S., Triche, T., Bootwalla, M. (2013) Methylumi: Handle Illumina methylation data (R package version 2.6.1).
11. Decock A., Ongenaert M., Hoebeek J. et al. Genome-wide promoter methylation analysis in neuroblastoma identifies prognostic methylation biomarkers // Genome Biol. - 2012. -Vol. 13 (10). - P. 95.
12. Devaney J.M., Wang S., Funda S. et al. Identification of novel DNA-methylated genes that relate with human prostate cancer and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia // Prostate Cancer Prostatic Dis. - 2013. - Vol.16. - P. 292-300.
13. Ellinger J., Kahl P., von der Gathen J. et al. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence // Prostate. - 2010. - Vol. 70 (1). - P. 61-69.
14. Falcon S., Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association // Bioinformatics. - 2007. - Vol. 23 (2). - P. 257-258.
15. Flegel C., Manteniotis S., Osthold S. et al. Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing // PLoS One. 2013. - Vol. 8 (2). - P. 55368.
16. Haldrup C., Mundbjerg K., Vestergaard E.M. et al. Sorensen KD. DNA methylation signatures for prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy of clinically localized prostate cancer // J. Clin. Oncol. - 2013. - Vol. 31. - P. 3250-3258.
17. He H.J., Gu X.F., Xu W.H. et al. Krppel-like factor 8 is a novel androgen receptor co-activator in human prostate cancer. // Acta Pharmacol Sin. - 2013. - Vol. 34 (2). - P. 282-288.
18. Geybels M.S., Zhao S., Wong C.J. et al. Epigenomic profiling of DNA methylation in paired prostate cancer versus adjacent benign tissue // Prostate. - 2015. - Sep 18.
19. James S.R., Cedeno C.D., Sharma A. et al. DNA methylation and nucleosome occupancy regulate the cancer germline antigen gene MAGEA11 // Epigenetics. - 2013. - Vol. 8 (8). - P. 849-863.
20. Jensen T.J., Novak P., Eblin K.E. et al. Epigenetic remodeling during arsenical-induced malignant transformation // Carcinogenesis. - 2008. - Vol. 29 (8). - P. 1500-1508.
21. Jerome F., Trevor H., Robert T. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent // Journal of Statistical Software. - 2010. - Vol. 33 (1). - P. 1-22.
22. Jeronimo C., Usadel H., Henrique R. et al. Quantitative GST P11 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer // Urology. - 2002. - Vol. 60. - № 6. - P. 1131-1135.
23. Kim J.W., Kim S.T., Turner A.R. et al. Identification of new differentially methylated genes that have potential functional consequences in prostate cancer // PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7. -e48455.
24. Kobayashi Y., Absher D.M., Gulzar Z.G. et al. DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer // Genome Res. - 2011. - Vol. 21 (7). - P. 1017-1027.
25. Kolbe D.L., DeLoia J.A., Porter-Gill P. et al. Differential analysis of ovarian and endometrial cancers identifies a methylator phenotype // Califano J. ed. PLoS One. - 2012. - Vol. 7 (3). -e32941.
26. Langford D.J., Paul S.M., West C.M. et al. Variations in potassium channel genes are associated with distinct trajectories of persistent breast pain after breast cancer surgery // Pain. - 2015. - Vol. 156 (3). - P. 371-380.
27. Li L.C. Epigenetics of prostate cancer // Front. Biosci. - 2007. - Vol. 12. - P. 33773397.
28. Lin P.C., Giannopoulou E.G., Park K. et al. Epigenomic alterations in localized and advanced prostate cancer // Neoplasia. - 2013. - Vol. 15 (4). - P. 373-383.
29. Mahapatra S., Klee E.W., Young C.Y. et al. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer // Clin. Cancer Res. - 2012. - Vol. 18. - P. 2882-2895.
30. Neuhaus E.M., Zhang W., Gelis L. et al. Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells // J. Biol. Chem. - 2009. - Vol. 284 (24). - P. 16218-16225.
31. Pavlova T.V., Kashuba V.I., Muravenko O.V. et al. Technology of analysis of epigenetic and structural changes of epithelial tumors genome with NotI-microarrays by the example of human chromosome // Mol. Biol. - 2009. - Vol. 43 (2). - P. 339-347.

32. Reka A.K., Chen G., Jones R.C., Amunugama R. et al. Epithelial-mesenchymal transition-associated secretory phenotype predicts survival in lung cancer patients // *Carcinogenesis*. – 2014. – Vol. 35 (6). – P. 1292-1300.
33. Shen J., Wang S., Zhang Y-J. et al. Genome-wide DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55. – P. 1799-1808.
34. Schweikert E.M., Devarajan A., Witte I. et al. PON3 is up-regulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death // *Cell Death Differ.* – 2012. – Vol. 19 (9). – P. 1549-1560.
35. Smyth, G.K., Gentleman R., Carey V., et al. Limma: linear models for microarray data // *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, - 2005. - P. 397-420. Springer, New York.
36. Staibano S., Mascolo M., Mancini F.P. et al. Overexpression of chromatin assembly factor-1 (CAF-1) p60 is predictive of adverse behaviour of prostatic cancer // *Histopathology*. – 2009. – Vol. 54 (5). – P. 580-589.
37. Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6 (7). – e21800.
38. Takanami I., Inoue Y., Gika M. G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK 1) gene expression correlates with tumor progression in non-small cell lung cancer // *BMC Cancer*. – 2004. – Vol. 13 (4). – P. 79.
39. Teschendorff A., Liu X., Caren H. et al. The dynamics of DNA methylation covariation patterns in carcinogenesis // *PLoS Comput Biol.* – 2014. - Vol. 10 (7). - e1003709.
40. Teschendorff A., Marabita, F., Lechner M. et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29 (2). – P. 189-196.
41. Tham C., Chew M., Soong R. et al. Postoperative serum methylation levels of TAC1 and SEPT9 are independent predictors of recurrence and survival of patients with colorectal cancer // *Cancer*. – 2014. – Vol. 120. – P. 3131– 3141.
42. Triche T.J., Weisenberger D.J., Van Den Berg D. et al. Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41 (7). – e90.
43. Witte I., Foerstermann U., Devarajan A. et al. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer // *J. Lipids*. – 2012. – P. 342806.
44. Wrangle J., Machida E.O., Danilova L. et al. Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for the diagnosis of lung cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1856–1864.
45. Xavier R., Natacha T., Alexandre H. et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 77.
46. Xu D., Qu L., Hu J. et al. Transmembrane protein 106A is silenced by promoter region hypermethylation and suppresses gastric cancer growth by inducing apoptosis // *Cell Mol Med.* – 2014. – Vol. 18 (8). – P. 1655-1666.
47. Yassen A., Mller F., Lutsik P. et al. Comprehensive Analysis of DNA Methylation Data with RnBeads // *Nature Methods*, - 2014. – Vol. 11 (11). – P. 1138-1140.
48. Site: The Human Protein Atlas - www.proteinatlas.org
49. Site: TCGA - The Cancer Genome Atlas - <https://tcga-data.nci.nih.gov>

Поступила в редакцию 06.11. 2015 г.

*K.A.Babalyan², R.Sultanov², E.V.Generozov¹,
N.B.Zakharzhevskaya¹,
E.I.Sharova¹, M.N.Peshkov¹, A.O.Vasilev³, A.V.Govorov³,
D.Yu.Pushkar³,
E.A.Prilepskaya³, S.A.Danilenko¹, E.A.Babikova²,
A.K.Larin¹, V.M.Govorun^{1,2}*

Genome-wide analysis of DNA methylation in prostate cancer using technology Infinium HumanMethylation450 BeadChips

¹Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency

²Moscow Institute of Physics and Technology (State University)

³A.I.Evdokimov Moscow State Medical and Dental University
Moscow, Russia

Using the technology of DNA chips Infinium HumanMethylation450 BeadChip it was analyzed quantitative DNA methylation status in 12 paired samples of prostate adenocarcinoma, and morphologically altered tissues. Analysis of differentially methylated regions of the genome showed an association with abnormal status for 21610 and 3852 hypomethylated hypermethylated CpG sites. Dominance in the cancer genome hypermethylated sites and their predominant localization in the regulatory regions of genes indicate their possible role in the implementation of mechanisms of gene suppression in the pathogenesis of prostate cancer (PCa). For 14 genes studied were characterized array maximum values hypermethylation in promoter region (> 50% CpG sites) in combination with a high level of methylation differences between treatment groups (> 40%). Role of hypermethylation in some of them: AOX1, KLF8, ZNF154, TMEM106A in the pathogenesis of prostate cancer has been showed previously. Hypermethylation of genes ACSS3, TAC1, TUBA4B, ZSCAN12 not previously been shown for prostate cancer, but is characterized by the association with other cancers. In turn, the differences in the levels of methylation in genes GPRASP1, NKX2-6, ARX, CYBA, EPSTI1, RHCG been documented as a result of a number of genome-research oncology, but has not been studied in detail. To assess the diagnostic potential of epigenetic markers of prostate cancer there was carried out unbiased selection of individual CpG sites most reliably discriminate against tumor samples from a group of no tumor samples. In selected diagnostic model based on logistic regression included 9 CpG sites. Validation of the model was carried out on an independent dataset of methylation of 40 paired samples from the prostate cancer project Atlas of Cancer Genome (TCGA) analyzed on the same version of the DNA chip. Summarized rates of diagnostic informativeness of a model (specificity 95%, sensitivity of 97%, the area under the curve of the diagnostic test (ROC) - 0,96), obtained after validation, allow us to consider these CpG Sites as potential markers for molecular diagnosis of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, DNA methylation, diagnostics