

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АБЕРРАНТНО МЕТИЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ *SEPT9* И *VIM* ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

О.И. Бровкина^{1*}, М.Г.Гордиев², Д.С. Ходырев¹,
А.Г. Никитин¹, А.В. Аверьянов¹

¹Федеральный научно-клинический центр специализированных видов
медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, г. Москва,
²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ», г. Казань

Определение эпигенетических нарушений имеет большое значение для ранней диагностики колоректального рака (КРР). Для получения модели диагностической тест-системы с высокими показателями чувствительности и специфичности мы определяли частоту метилирования в генах *SEPT9* и *VIM*. При анализе эпигенетических нарушений нами также учитывались мутации в генах семейства *RAS*. В нашей работе подтверждается наличие aberrантного метилирования в генах *SEPT9* и *VIM* в клетках опухоли. ДНК образцов опухоли была достоверно чаще метилирована, чем ДНК образцов прилежащей ткани ($P = 8,67E-19$ для гена *SEPT9* и $P = 8,68E-19$ для гена *VIM*). В группе пациентов, имеющих мутации в генах *KRAS* или *NRAS*, ДНК опухолевых образцов достоверно чаще метилирована в гене *SEPT9* ($P = 0,0018$), в отличие от ДНК опухолевых образцов пациентов, не несущих данных мутаций. Нами было продемонстрировано, что использование совокупности маркеров метилирования позволяет улучшить чувствительность тест-систем, используемых в диагностике КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, aberrантное метилирование, гены *SEPT9*, *VIM*.

THE USE OF ABERRANT METHYLATED GENES *SEPT9* AND *VIM* FOR CLINICAL DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

Brovkina O.I., Gordiev M.G., Khodyrev D.S., Nikitin A.G., Averyanov A.V.

Definition of epigenetic disorders is important for early diagnosis of colorectal cancer. To obtain a model of diagnostic test system with high sensitivity and specificity, we determined the frequency of methylation in *SEPT9* and *VIM* genes. Epigenetic events also were compared with mutations in the *RAS* family genes. It was confirmed the presence of aberrant methylation in *SEPT9* and *VIM* genes in tumor cells. DNA of tumor samples was significantly more methylated than samples with DNA from adjacent tissue ($P = 8,67E-19$ for *SEPT9* gene and $P = 8,68E-19$ for *VIM* gene). In the group of patients carried mutations in *KRAS* or *NRAS* genes tumor DNA significantly more methylated in gene *SEPT9* ($P = 0,0018$), in contrast to the tumor DNA from patients not carried mutations. We have demonstrated that the combined use of methylation markers can improve the sensitivity of the test systems used in the diagnostics of colon cancer.

Keywords: colorectal cancer, aberrant methylation, *SEPT9*, *VIM* genes.

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее агрессивных типов рака и занимает второе место по распространенности в России. Было доказано, что одна из основных причин, влияющих на развитие этого заболевания, – эпигенетические нарушения регуляции генов [1]. Определение эпигенетических нарушений имеет большое значение для ранней диагно-

стики раковых заболеваний, так как нарушенная регуляция генов вследствие aberrантного метилирования ДНК является ключевой стадией в развитии опухоли [2]. При этом, метилированная ДНК является достаточно информативным биомаркером и может быть легко измерена в образцах крови или плазмы [3]. Метилирование обширных регионов CpG-островков

– основное эпигенетическое изменение, характерное для процессов канцерогенеза при КРР.

В настоящий момент на рынке представлены зарубежные коммерческие наборы для определения aberrантного метилирования генов *SEPT9* либо *VIM*, однако эти наборы выпускаются разными фирмами и применение в диагностической практике сразу двух генов затруднительно.

Использование лишь одного маркера метилирования зачастую недостаточно для эффективной диагностики заболевания, так как показатели чувствительности и специфичности отдельных маркеров невысоки, поэтому представляет интерес проверка диагностических характеристик модели из нескольких маркеров. Для этих целей мы определяли частоту метилирования в генах *SEPT9* и *VIM*.

Наличие aberrантного метилирования в гене *SEPT9* тесно связано с развитием КРР. Даже на ранних стадиях КРР отмечается гиперметилирование гена *SEPT9* [1]. Септин принадлежит к классу ГТФ-связывающих полипептидов, которые задействованы в большом количестве клеточных процессов [4]. У людей в общей сложности 13 генов септина. Все септины могут образовывать гетеромерные комплексы и участвуют в формировании структур наподобие нитей, колец и клеток. Эти уникальные структуры участвуют в клеточном делении, формируют плазму мембраны, кольца сперматозоидов, основания ресничек и дендритов [5, 6].

Ген *SEPT9* расположен на хромосоме 17q25.3, и экспрессируется в большинстве клеток человека. Было показано, что *SEPT9* имеет 18 различных транскриптов, которые кодируют 15 полипептидов [7]. Они играют важную роль в динамике актина, в процессах ангиогенеза, в подвижности и пролиферации клеток, цитокинезе, регуляции микротрубочек, и процессах экзоцитоза. Несколько недавних исследований показывают, что *SEPT9* занимает концевую позицию в октамерциссептиновом комплексе и играет ключевую роль в полимеризации субъединиц и стабилизации целых гетеромеров [8]. Это также имеет важное значение для окончательного разделения дочерних клеток во время цитокинеза.

Продукт гена *VIM*, виментин, входит в состав цитоскелета, а также задействован в иммунном ответе и контролирует транспорт липопротеинов низкой плотности. *VIM* содержит богатый CpG динулеотидами промотерный регион, рядом с которым расположен первый экзон, являющийся мишенью для ДНК-метилтрансфераз.

Было показано, что в 53-84% образцов опухоли и сыворотки больных КРР имеет место метилирование гена *VIM* [9, 10], таким образом, метилированный ген *VIM* является потенциальным маркером для диагностики КРР.

Важно отметить, что маркерные молекулы для диагностики заболеваний не всегда лежат в основе развития заболеваний. Данное утверждение в особенности справедливо для маркеров метилирования. В ряде работ было показано отсутствие прямой корреляции между aberrантным метилированием и выраженностью экспрессии генов [11, 12].

При анализе генома пациентов с КРР очень часто выявляются мутации (частота до 40%) [13]. *KRAS* является геном, кодирующим один из белков, играющих важную роль в сигнальной системе рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) – сложного сигнального каскада, принимающего участие в развитии и прогрессировании рака. Белок *KRAS* регулирует другие белки, находящиеся далее в сигнальной системе EGFR, которые связаны с выживаемостью опухоли, ангиогенезом, пролиферацией и метастазированием [14].

При метастатическом колоректальном раке почти 60% пациентов имеют нормальную сигнальную систему EGFR и дикий тип гена *KRAS*; остальные 40% имеют мутантный тип гена [13].

Тестирование генов, кодирующих белки семейства RAS (K-RAS и N-RAS) позволяет отобрать пациентов с диким типом (без мутации) генов RAS, у которых может быть получен ответ при лечении моноклональными антителами, блокирующими EGFR.

В данном исследовании мы обладали возможностью сопоставить статус мутации генов семейства RAS с наличием aberrантного метилирования в выбранных нами генах.

Основной задачей этой работы был анализ метилирования промотерных участков генов *SEPT9* и *VIM* у пациентов с КРР для формирования единой панели эпигенетических маркеров, позволяющей диагностировать данную онкопатию с высокой чувствительностью и специфичностью.

Материалы и методы

Работа была одобрена локальным этическим комитетом, выполнена в соответствии с требованиями GCP (Good Clinical Practice) и Хельсинской декларацией по защите прав человека.

Исследование включало 150 парных образцов опухолевой ткани с известным статусом мутации генов семейства RAS и прилегающей гистологически неизменной ткани пациен-

тов с аденокарциномой прямой кишки, проходивших лечение в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Татарстан в 2008-2012 годах (таблица 1). Каждый пациент подписал добровольное информированное согласие на участие в проведении исследования. Опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [12, 13]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов. Отбирали образцы из первичных очагов с содержанием опухолевых клеток не менее 50%.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов

Пол	Количество
мужской	72
женский	78
Возраст	
>50	124
<50	26
Стадия опухоли	
T2M0	11
T3M0	36
T4M0	38
T2M1	2
T3M1	18
T4M1	28

Выделение ДНК осуществлялось набором QIAamp DNA FFPE Tissue Kit («Qiagen», Германия), концентрацию суммарной ДНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», Великобритания) по соотношению оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм. Бисульфитная конверсия и очистка проводились наборами EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit («Qiagen», Германия) с помощью автоматической станции пробоподготовки QIAcube («Qiagen», Германия). Изучение профилей метилирования производилось с помощью метода MethyLight PCR с олигонуклеотидами (таблица 2), подобранными на локусы, содержащие дифференциально метилируемые CpG-островки, на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems («Applied Biosystems», США). В качестве неметилированного гена сравнения

использовали *COL2A1*. Для определения степени метилирования вычисляли величину порогового цикла (Ct) для каждого гена-мишени, затем величину ΔCt (мишень-контроль), после значение $\Delta\Delta Ct$ (мишень-калибратор). Величина RQ рассчитывалась по формуле $RQ=2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Метилированным считался образец с $RQ>10$.

Статус мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* определяли с помощью наборов KRAS-24 и NRAS-24 (ООО «Тестген», Россия).

Статистический анализ данных проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0.05. Конкордантность данных по метилированию оценивали с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмана. Значимость корреляции по Спирману (R_s) проверяли с помощью t-теста Стьюдента: с числом степеней свободы $v = N - 2$, где N – размер выборки. Уровень значимости принят равным 10^{-6} .

Чувствительность и специфичность маркеров оценивались с помощью ROC-анализа (MedCalc.2 software)

Результаты и обсуждение

В данном исследовании подтвердилось наличие aberrантного метилирования у пациентов, больных КРР. ДНК образцов опухоли была достоверно чаще метилирована, чем ДНК образцов прилежащей ткани ($P=8,67E-19$ для гена *SEPT9* и $P=8,68E-19$ для гена *VIM*) (рис. 1). Довольно интересно, что гены *SEPT9* и *VIM* не являются биологически значимыми маркерами в развитии КРР, однако ценность их как диагностических маркеров представляется нам очень высокой, так как в отличие от таких маркеров, как *MLH1* и *MGMT* (продукты которых участвуют в канцерогенезе), они обладают высокими показателями как чувствительности, так и специфичности (чувствительность 60-70% для *SEPT9* и *VIM*)

По результатам проведенной работы мы выявили, что в группе пациентов, имеющих мутации в генах *KRAS* или *NRAS*, ДНК опухолевых образцов достоверно чаще метилирована в гене *SEPT9* ($P=0.0018$), в отличие от ДНК опухолевых образцов пациентов, не несущих данных мутаций. В исследованиях похожей тематики также подтверждается частое гиперметилирование промотерных участков генов при наличии активирующих мутаций гена *KRAS* [15]. Биологические основы этого обстоятельства на сегодняшний день до конца не изучены. Мы можем предположить, что процессы канцерогенеза у носителей мутаций в генах семейства

Таблица 2

Параметры праймеров и зондов для ПЦР в режиме реального времени

Ген	Последовательность, 5'-3'	Длина продукта	Условия реакции, °C
<i>SEPT9</i>	Праймер - FM, TAGGGTTCGGGTTTCGTCG, 57C Праймер - RM, TTTCAAAACTTCGAAATCCG, 51C Зонд - CGCGTTAACCGCGAAATCCG-BHQ1, 61C	98	51
<i>VIM</i>	Праймер - FM, GGCGGTTCGGGTATCG, 56C Праймер - RM, CGTAATCACGTAACCTCCGACT, 54C Зонд - GACGCGGAGGCGAGTCGGTTCG-BHQ1, 63C	146	54
<i>COL2A1</i>	Праймер - FM, AGGGTAATTTTGGGAATAGATGGA, 64C Праймер - RM, TCTCCTAAATAACAAAATCCACAA, 63C Зонд - СААСACTСАСААСААATCCTTTAACTCCAA –BHQ2, 69C	83	54

RAS протекают в целом быстрее и агрессивнее [16, 17], поэтому aberrантное метилирование в некоторых генах у пациентов-носителей мутаций также будет выражено сильнее.

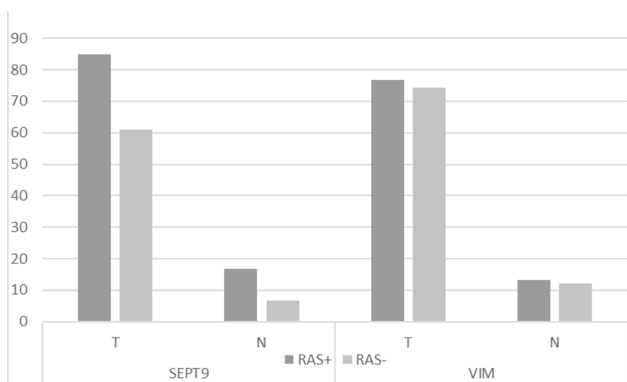


Рис. 1. Процент метилированных образцов в зависимости от статуса мутации генов, кодирующих белки семейства *RAS*.

Мы провели корреляционный анализ для выявления зависимости степени прогрессирования КРР (учитывалось наличие или отсутствие метастазов) и частоты метилирования. Корреляция между данными показателями оказалась очень слабой ($r=0,03967$, $P>0,05$ для гена *SEPT9*, $r=0,08871$, $P>0,05$ для гена *VIM*). Вероятно, для выявления степени прогрессирования КРР следует анализировать профиль метилирования.

На сегодняшний день для диагностики колоректального рака существуют наборы для определения метилирования в гене *SEPT9*, либо набор для определения метилирования в гене *VIM*, однако обеспечить лишь одним из данных наборов необходимые для диагностики показатели чувствительности и специфичности представляется затруднительным. Использование нескольких маркеров позволили бы улучшить показатели диагностических тест-систем.

В рамках данной работы был рассчитан индекс метилирования для каждого образца и проверены

параметры чувствительности и специфичности как для совокупности маркеров, так и для каждого маркера в отдельности. За пороговое значение для анализа совокупности маркеров был взят индекс метилирования, равный 0,5. Под индексом метилирования понимается отношение числа метилированных локусов к общему числу локусов модели. При этом значении система из маркеров имеет высокие показатели чувствительности и специфичности (91,3% и 78,0% соответственно). AUC, показатель интегральной оценки качества и предсказательной способности модели, составляет 0,90, что говорит о высоком качестве модели.

Таким образом, использование нескольких маркеров при диагностике КРР позволяет существенно улучшить параметры тест-системы.

Выводы

В данной работе подтверждается высокая частота метилирования генов *SEPT9* и *VIM* в опухолевых тканях больных КРР.

Для генов *SEPT9* и *VIM* были установлены высокие показатели чувствительности и специфичности (чувствительность 70,7% и специфичность 89,4% для *SEPT9*, чувствительность 75,3% и специфичность 87,3% для *VIM*), которые считаются важными клиническими маркерами, имеющими большие перспективы в диагностике КРР.

В настоящем исследовании мы показали, что

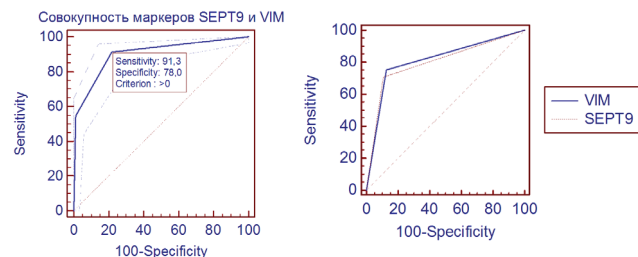


Рис. 2. Сравнение результатов ROC-анализа для каждого маркера в отдельности и для совокупности маркеров.

ДНК опухолевых образцов пациентов с мутациями в гене *KRAS* достоверно чаще метилирована в гене *SEPT9* ($P=0.0018$) в отличие от ДНК опухолевых образцов пациентов, не несущих данных мутаций. Однако биологические основы этих результатов требуют дальнейших исследований.

Нами было продемонстрировано, что использование совокупности маркеров метилирования, таких как *SEPT9* и *VIM*, позволяет улучшить чувствительность тест-систем, используемых в диагностике КРП, но показатели специфичности

остаются на прежнем уровне. В связи с полученными результатами нами планируется проверить эффективность таких маркеров метилирования, как *APC*, *ITGA4*, *RASSF1A*, а также оценить показатели системы, состоящей из пяти маркеров.

Таким образом, внедрение в практику теста, основанного на определении маркеров КРП, может сократить время и облегчить процедуру диагностики данного заболевания, а также служить хорошим средством для оценки динамики состояния пациентов.

Литература:

1. Jones P.A., Baylin S.B. 2007. The Epigenomics of Cancer. *Cell*. 2007;128: 683–692.
2. Wild N., Andres H., Rollinger W., et al. A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):6111–21. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0119.
3. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37: 646–650.
4. Russell S.E.H., Hall P.A. Do septins have a role in cancer? *Br. J. Cancer*. 2005;93: 499–503.
5. Kinoshita M., Noda M. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Struct Funct*. 2001;26: 667–670.
6. Joo E., Tsang C.W., Trimble W.S. Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic Cph. Den*. 2005;6: 626–634.
7. McDade S.S., Hall P.A., Russell S.E.H. Translational control of SEPT9 isoforms is perturbed in disease. *Hum Mol Genet*. 2007;16: 742–752.
8. Estey M.P., Di Ciano-Oliveira C., Froese C.D., Bejide M.T., Trimble W.S. Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *J Cell Biol*. 2010;191: 741–749.
9. Zou H., Harrington J.J., Shire A.M., et al. Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Dec;16(12):2686–96.
10. Brenner D.E., Rennert G. Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 1107–9.
11. Schneider K.U., Dietrich D., Fleischhacker M., et al. Correlation of SHOX2 Gene Amplification and DNA Methylation in Lung Cancer Tumors. *BMC Cancer*. 2011 Mar 22;11:102. doi: 10.1186/1471-2407-11-102.
12. Mikeska T., Craig J.M. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes*. 2014;5:821–864.
13. Linardou H., Briasoulis E., Dahabreh I.J., et al. 2011. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev*. 2011;37: 221–233.
14. Ying H.-Q., Wang F., He B.-S., et al. The involvement of Kras gene 3'-UTR polymorphisms in risk of cancer and influence on patient response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Ther*. 2014;7: 1487–1496.
15. Кит О.И., Водолажский Д.И., Дваденко К.В., et al. 2016. Аберрантное метилирование промоторных участков генов APC, CDH13 и MGMT у больных колоректальным раком. *Сибирский Онкологический Журнал*. 2016;15: 48–55.
16. Cerottini J.P., Caplin S., Saraga E., Givel J.C., Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg*. 1998;175: 198–202.
17. Беляева А.В. 2012. Мутации в гене K-RAS у больных колоректальным раком.

Информация об авторах:

Бровкина Ольга Игоревна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России,
E-mail: brov.olia@gmail.com

Гордиев Марат Гордиевич – заведующий Молекулярно-диагностической лабораторией ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ Республики Татарстан»
E-mail: marat7925@gmail.com

Ходырев Дмитрий Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА
E-mail: DmKh008@gmail.com

Никитин Алексей Георгиевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией генетики ЦБМТ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
Тел.: 8 (926) 2177172, e-mail: avialn@gmail.com

Аверьянов Александр Вячеславович – заведующий отделением пульмонологии ФНКЦ ФМБА России, руководитель Центра биомедицинских технологий, д.м.н.
Тел.: +7 (495) 395-05-11; факс: +7 (495) 395-64-30; e-mail: averyanovav@mail.ru