

DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-48-55

УДК: 616-006.66:575.23

АБЕРРАНТНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ *APC*, *CDH13* И *MGMT* У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

О.И. Кит, Д.И. Водолажский, К.В. Двадненко, И.И. Ефимова,
Е.Н. Олейникова, Д.Д. Олейников, Н.Н. Тимошкина

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
г. Ростов-на-Дону
344036, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63. E-mail: n_timoshkina@mail.ru

Аннотация

Аберрантное метилирование промоторных участков генов – основное эпигенетическое изменение, характеризующее колоректальные неопластические образования. В настоящей работе был исследован количественный уровень метилирования 42 CpG-сайтов промоторных участков генов *MGMT*, *APC* и *CDH13* в опухолях толстой кишки по отношению к уровню метилирования прилегающей условно нормальной ткани 25 пациентов. С помощью метода пиросеквенирования выявлено повышение уровня метилирования промоторных участков генов *MGMT*, *APC* и *CDH13* в опухолевых образцах от 3 до 5 раз. В этих же образцах опухолей проведен скрининг активирующих SNP-мутаций в онкогенах *KRAS* (40 %), *NRAS* (0 %) и *BRAF* (0 %). Наличие SNP-мутаций в гене *KRAS* сопровождалось гиперметилированием одного или более промоторов исследованных генов. Доказана ассоциация этого эпигенетического показателя с метастазированием опухоли. Полученные данные об увеличении метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров могут быть использованы в качестве чувствительных прогностических маркеров прогрессирования и метастазирования колоректального рака.

Ключевые слова: CpG-метилирование, колоректальный рак, гены *MGMT*, *APC*, *CDH13*, *CIMP*.

Колоректальный рак (КРР) – гетерогенное злокачественное новообразование, занимающее третье место в мире в структуре заболеваемости и смертности среди других злокачественных опухолей [2]. В 1988 г. В. Vogelstein et al. предложили первую линейную модель онкогенеза толстой и прямой кишки [22] на базе исторически сложившихся представлений о процессе малигнизации тканей как накоплении в клетке событий хромосомной нестабильности и мутаций в онкогенах и генах-супрессорах. В последующие десятилетия после серьёзных успехов в исследовании микросателлитной нестабильности (MSI) и метилирования генома были описаны несколько альтернативных цепочек молекулярных событий при развитии КРР [7]. Основными маркерами предложенной классификации КРР, объединяющей аберрантные структурные и молекулярные изменения, стали взаимоисключающие активирующие мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, инактивирующие мутации в гене – онко-супрессоре *APC*, MSI и статус метилирования генома в целом, и генов *MLH1* и *MGMT*, в частности [10, 17]. Кроме определения клинико-морфологических особенностей, понимание роли генетических и эпигенетических изменений в патогенезе КРР даёт информацию для разработки новых биомаркеров эффективного

профилактического скрининга, выбора таргетной терапии, прогнозирования течения заболевания и ответа на лечение.

Метилирование обширных регионов CpG-островков (так называемый фенотип метилированных CpG островков или *CIMP*) – основное эпигенетическое изменение, описанное в колоректальных неопластических образованиях. Частота обнаружения *CIMP* в случаях спорадического КРР, по разным оценкам, колеблется от 15 до 50 % [12].

APC, *CDH13* и *MGMT* – гены-онкосупрессоры, транскрипция которых часто подавляется в опухолях человека посредством аберрантного метилирования промоторных участков [4, 12, 13], что функционально эквивалентно инактивирующей мутации [6]. Однако большая часть данных по этим и другим генам была получена с помощью метода аллель-специфичной PCR (MSP), обладающего рядом методических ограничений [14]. Например, в случае использования метода MSP затруднительно идентифицировать фоновый уровень метилирования, так как даже в условно нормальной ткани может отмечаться негативная эпигенетическая регуляция активности генов-онкосупрессоров, связанная, например, с возрастом [9, 16].

Цель исследования – количественный анализ CpG-метилирования промоторных участков

генов-онкосупрессоров *APC*, *CDH13* и *MGMT* в операционных биоптатах условно нормальной и опухолевой ткани толстой кишки в сочетании с идентификацией активирующих SNP-мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*.

Материал и методы

В исследование были включены 25 пациентов с умеренно (G_2) и низкодифференцированным (G_3) раком толстой кишки (табл. 1), проходивших стационарное лечение в ФГБУ РНИОИ в 2013–14 гг. Медиана возраста составила 59 лет. Каждый пациент подписал добровольное информированное согласие на участие в проведении исследования.

Тотальную ДНК из опухолевых и условно здоровых тканей выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [1]. Бисульфитное конвертирование ДНК проводили согласно протоколу, предложенному К. Patterson et al. [18] в собственной модификации: для удаления бисульфит-ионов использовали набор очистки ДНК из реакционных смесей (BioSilica, Россия). Количественное метилирование 42 CpG-сайтов трёх генов (*APC*, *CDH13* и *MGMT*) оценивали методом пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen, Germany). По результатам

пробных экспериментов для наработки ампликонов и собственно пиросеквенирования были выбраны праймеры (табл. 2). Ампликоны, полученные после постановки ПЦР на матрице бисульфит-конвертированной ДНК, подвергали очистке, денатурации и отмывке с последующим отжигом с секвенирующим праймером при 80°C и постановкой реакции пиросеквенирования. Постановку пиросеквенирования каждого образца проводили, как минимум, в двух повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software (Qiagen, Germany). Значение метилирования отдельного CpG-сайта, рассчитанного как отношение содержания нуклеотидов C/T (рис. 1), использовали для вычисления усредненного метилирования промоторного участка каждого гена (Met, %).

Методом прямого секвенирования по Сэнгеру (AB3500, LifeTechnologies, USA) идентифицировали мутации во 2, 3 и 4-м экзонах генов *KRAS* и *NRAS*. В настоящее время скрининг наличия мутаций не только в гене *KRAS*, но и *NRAS* становится обязательным для характеристики KPP-опухолей в целях определения стратегии лечения с использованием таргетных препаратов [20]. Скрининг мутации V600E в гене *BRAF* осуществляли с

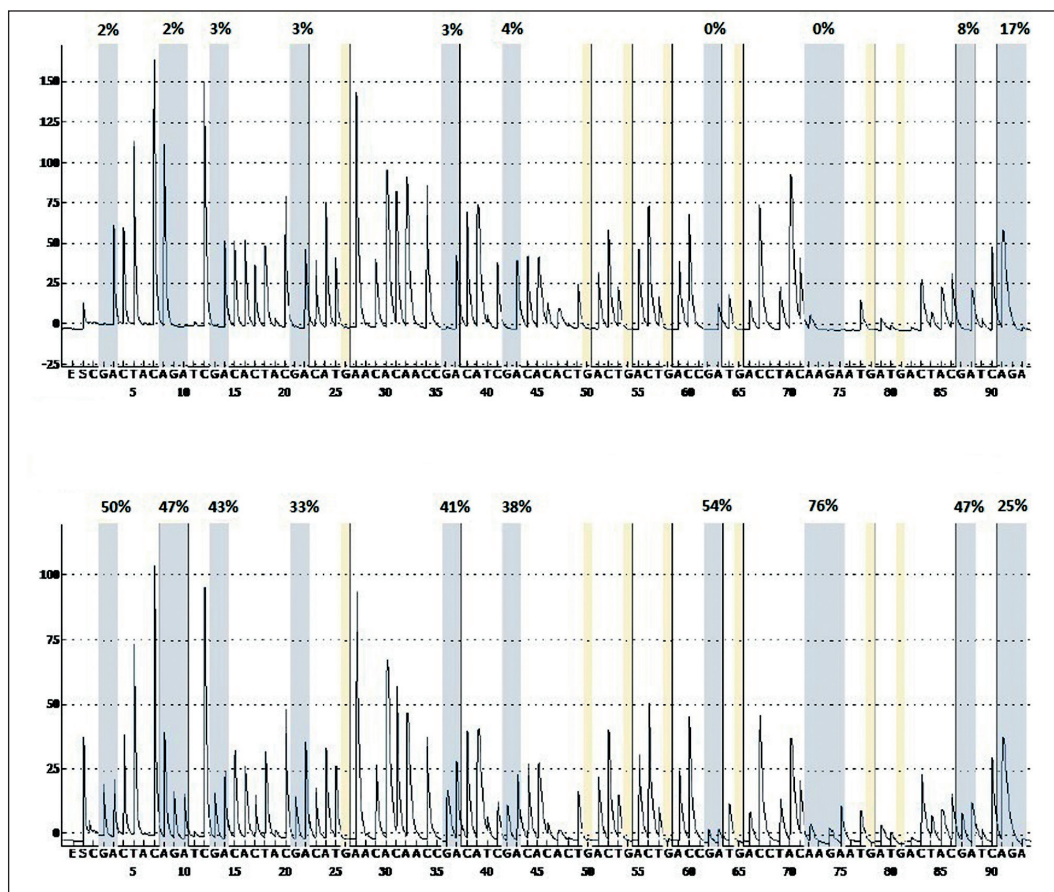


Рис. 1. Пример пираграмм промоторной последовательности гена *APC*, полученных с помощью секвенирующего праймера Py1 для образцов условно нормальной (вверху) и опухолевой (внизу) ткани. Значения соотношения C/T указаны в процентах над каждым анализируемым CpG-сайтом

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика пациентов

Параметры		Количество больных
Стадия опухоли	T ₃ N ₀ M ₀	5 (20 %)
	T ₃₋₄ N ₁ M ₀	12 (48 %)
	T ₃₋₄ N ₁₋₂ M ₁	8 (32 %)
Гистологический тип опухоли	Аденокарцинома	24 (96 %)
	Слизистый рак	1 (4 %)
Дифференцировка опухоли	G ₂	22 (88 %)
	G ₃	3 (12 %)
Пол	Женщины	13 (52 %)
	Мужчины	12 (48 %)
Возраст, лет	<55	10 (40 %)
	>55	15 (60 %)

использованием набора «Real-Time-PCR-BRAF V600E» («Биолинк», Россия).

Медиана, вариация, U-критерий Манна – Уитни и статистическая достоверность различий были вычислены для каждого CpG-сайта, а также в среднем по множеству CpG-сайтов каждого гена. Достоверность различий по частотным показателям определяли, используя χ^2 -тест. Все расчёты проведены с помощью программы Statistica v. 7.0 (Stat Soft Inc, 2004).

Результаты и обсуждение

Типичные пирограммы секвенс-анализа бисульфит-конвертированной ДНК, выделенной из условно нормальной и опухолевой тканей больных КРР, продемонстрированы на рисунке. Оценка метилирования по отдельным CpG-сайтам выявила неэффективность этого показателя в 10 CpG сайте ампликона APC/Pu1 (крайний справа на рисунке) и 12 CpG сайте ампликона MGMT/Re2 ввиду регистрации низкого уровня метилирования во всех пробах (медиана – 19 и 13 % соответственно), что обусловило отсутствие достоверных различий между опухолевой и условно нормальной тканью.

Усредненные данные по уровню метилирования (Met, %) промоторных участков каждого гена представлены в табл. 3. Во всех образцах условно нормальной ткани был зарегистрирован «фоновый» уровень Met промоторных участков трёх генов. Сравнительный анализ образцов опухолевой и условно нормальной тканей выявил достоверное повышение тотального показателя уровня Met в тканях КРР для генов MGMT (p=0,016) и CDH13 (p<0,001). Однако опухолевые образцы продемонстрировали высокую гетерогенность по данному показателю: по каждому из исследованных генов были зафиксированы случаи как гипер-, так и гипо-метилирования. Для отражения этого факта мы классифицировали выборку на подгруппы: условно нормальная ткань (N), колоректальные опухоли в целом (CRC), опухоли с повышенным уровнем метилирования по сравнению с нормой

(CRC-Met_H), опухоли, не отличающиеся от нормы (CRC-Met_L). Метилирование промоторных участков генов в подгруппе CRC-Met_H было статистически достоверно выше, чем в подгруппах N и CRC-Met_L по всем генам (p<0,001). Согласно значениям интерквартильного интервала в CRC-Met_H наблюдали и более высокое варьирование показателей уровня Met.

Гиперметилирование промоторного участка гена CDH13 фиксировали в 58 % случаев, тогда как группы CRC-Met_H по двум другим генам (APC и MGMT) насчитывали по 40 % от объёма исследованной выборки (табл. 3). Двадцать (80 %) образцов опухолей КРР из всего проанализированного нами массива данных продемонстрировали CpG-гиперметилирование хотя бы по одному гену, из них 4 (16 %) были гиперметилированы по всем трём генам.

Статус метилирования генов MGMT, APC, CDH13 при КРР был исследован ранее [12]. Однако все подобные исследования были выполнены с использованием метода MSP, что исключает прямое сравнение с нашими данными. Возможно, что в силу определенных ограничений MSP, позволяющего провести только качественную оценку CpG-сайтов по принципу высокого, среднего и низкого уровня метилирования, в работах по исследованию КРР представлены весьма разнородные данные частоты гиперметилирования генов. Например, по гену APC частота гиперметилирования в нашей работе составила 40 % против 21–28 %, определенной методом MSP; по гену CDH13 – 58 % против 32–65 % соответственно [12, 15].

Мы оценили корреляцию возрастных, гендерных и клинических показателей (табл.1) с уровнем CpG-метилирования исследованных промоторных участков. Ранее было показано отсутствие ассоциаций между возрастными, гендерными, гистологическими показателями и статусом CpG-метилирования гена APC в неопластических образованиях толстой кишки [5]. По данным других исследователей, с возрастом происходит увеличение уровня метилирования

Таблица 2

Последовательность праймеров (5'-3') для пиросеквенирования [14]

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Секвенирующий праймер
<i>APC</i>	biotin – ttt ttt tgt ttg ttg ggg att	act aca cca ata caa cca cat atc	Py1: aca caa cta ctt ctc tct cc
<i>APC</i>	-/-	-/-	Py2: ccc aca ccc aac caa
<i>CDH13</i>	ttg gga agt tgg ttg gtt g	biotin – aca acc cct ctt ccc tac ct	gga aaa tat gtt tag tgt ag
<i>MGMT</i> (Fw)	gga tat gtt ggg ata gtt	biotin-aca aca cct aaa aaa cac tta aaa c	gat ttg gtg agt gtt tgg gt
<i>MGMT</i> (Re)	biotin- gga tat gtt ggg ata gtt	aca ac acct aaa aaa cac tta aaa c	acc acc aca ctc acc aaa tc

Таблица 3

Метилирование промоторных участков генов *APC*, *MGMT* и *CDH13* в условно нормальной и опухолевой тканях

Ген	Группа	Количество	Медиана Met, %	Интерквартильный интервал Met, %	Достоверность различий Met по сравнению с условно нормальной тканью в U-тесте, p
<i>APC</i>	N	25	6,0 %	4,3–7,5 %	
	CRC-Met_H	10 (40 %)	31,8 %	11,6–34,5 %	<0,001*
	CRC-Met_L	15 (60 %)	4,5 %	3,0–8,0 %	0,212
<i>CDH13</i>	CRC	25	9,0 %	3,5–14,0 %	0,195
	N	24	10,0 %	8,0–11,8 %	
	CRC-Met_H	14 (58 %)	25,8 %	20,8–31,4 %	<0,001*
<i>MGMT</i>	CRC-Met_L	10 (42 %)	9,5 %	8,0–14,4 %	0,814
	CRC	24	16,5 %	12,0–26,4 %	<0,001*
	N	25	3,0 %	2,0–4,0 %	
<i>MGMT</i>	CRC-Met_H	10 (40 %)	10,5 %	9,3–16,3 %	<0,001*
	CRC-Met_L	15 (60 %)	2,8 %	2,0–4,0 %	0,924
	CRC	25	4,0 %	2,1–10,0 %	0,016*

Примечания: * – статистически значимые различия.

многих других генов-супрессоров опухолей [9, 16], в то же время возраст – главный фактор риска инициации КРР [2]. В нашем исследовании не было выявлено корреляции возраста и пола пациентов с уровнем метилирования исследованных CpG-сайтов в условно нормальной ткани, а также не обнаружено связи этих показателей с частотой гиперметилирования в опухолевой ткани (табл. 2, 3). Значение достоверности вероятности различий статуса метилирования гена *MGMT* в разных возрастных группах (p=0,064), очевидно, отражает тенденцию постепенного увеличения CpG-метилирования данного промоторного участка в нормальном эпителии по мере старения организма, что согласуется с установленным возрастзависимым метилированием другого гена mismatch-репарации *MLH1* [16]. Несмотря на предложение ряда исследователей исключать возрастзависимые маркеры метилирования из панелей определения CIMP, различия в уровнях метилирования таких генов у лиц одного возраста предполагают наличие и других неизвестных факторов, провоцирующих КРР-ассоциированные эпигенетические изменения [7].

Аберрантное метилирование ДНК присутствует не только на ранних этапах канцерогенеза, но и является признаком метастатического, прогрессирующего рака. Так, было показано, что гиперметилирование промоторного участка гена *APC* коррелирует с более высоким риском развития аденокарциномы из колоректальной аденомы [5] и встречается чаще в метастазах в печень, чем в первичных опухолях КРР [4]. Напротив, метилирование промоторного участка гена *CDH13* чаще встречается в неметастазирующих опухолях [8], что, очевидно, связано с многофункциональностью продукта этого гена – Т-кадгерина, который, участвует как в подавлении роста клеток путем контактного торможения, так и в стимулировании ангиогенеза в некоторых опухолях. В нашем исследовании CpG-метилирование промоторного участка гена *CDH13* присутствовало в 20 % случаев КРР без метастазов; в 58 % случаев КРР с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов (T₃₋₄N₁M₀) и в 50 % случаев КРР с отдаленными метастазами (T₃₋₄N₁₋₂M₁).

В целом сравнение частоты встречаемости гиперметилирования хотя бы по одному гену в

Таблица 4

Ассоциация метастазирования и метилирования промоторных участков генов APC, CDH13, MGMT в CRC с мутациями гена KRAS

Мутация гена KRAS	Количество KPP с мутацией	Стадия опухоли			Медиана Met		
		T ₃ N ₀ M ₀	T ₃₋₄ N ₁ M ₀	T ₃₋₄ N ₁₋₂ M ₁	APC	CDH13	MGMT
p.G12D	4		+		35,8 %*	6,8 %	4,2 %
			+		7,7 %	51,2 %*	2,7 %
			+		43,5 %*	25,0 %*	13,4 %*
p.G12C	2			+	9,1 %	31,1 %*	10,7 %*
			+		14,2 %*	33,5 %*	5,3 %
			+		5,4 %	20,3 %*	10,6 %*
p.G13D	1		+		13,2 %*	24,4 %*	16,4 %*
p.G12S	1		+		3,8 %	59,3 %*	11,0 %*
p.G12V	1	+			32,3 %*	25,7 %*	3,0 %
p.Q61H	1		+		11,6 %	14,7 %*	35,8 %*
Итого	10	1	8	1	5	10	7

Примечание: * – значения Met опухолевой ткани, статистически значимо отличающиеся от уровня Met условно нормальной ткани (p<0,05).

исследованной нами выборке позволяло статистически достоверно дифференцировать группу KPP без метастазирования (T₃N₀M₀) от групп только с метастазами в регионарные лимфатические узлы (T₃₋₄N₁M₀) ($\chi^2=6,39$, p=0,019) и с отдаленными метастазами (T₃₋₄N₁₋₂M₁) ($\chi^2=6,52$, p=0,017). Частота случаев с достоверным повышением CpG-метилирования в этих группах составила 40 % (T₃N₀M₀), 83 % (T₃₋₄N₁M₀) и 87 % (T₃₋₄N₁₋₂M₁).

Центральное место в описании молекулярно-генетического профиля злокачественных новообразований слизистой толстой и прямой кишки отводится активирующим мутациям в генах BRAF и KRAS [15, 17, 21], которые рассматриваются как события, инициирующие различные сигнальные пути канцерогенеза. Несмотря на установленную ранее частоту мутации BRAF V600E от 8 до 15 % для случаев спорадического KPP [21], в исследованной нами выборке не было обнаружено опухолей с положительным статусом по этой мутации.

У 10 (40 %) пациентов было определено 6 типов мутаций в гене KRAS (табл. 4) и ни одной мутации в гене NRAS. Частота мутаций в гене KRAS и распределение идентифицированных типов SNP соответствовали частоте их встречаемости в популяции больных KPP, по данным COSMIC [3] и нашим собственным данным [11]. Проведена идентификация с помощью метода прямого секвенирования по Сэнгеру достаточно редкой мутации p.Q61H в 3-м экзоне гена KRAS (<1 %).

Во всех 10 случаях при наличии активирующих SNP-мутаций в гене KRAS также было определено гиперметилирование промоторного участка хотя бы одного из трех исследованных генов (табл. 4). Известная ассоциация гиперметилирования гена mismatch-репарации MGMT с мутациями в гене KRAS [15, 20] не столь очевидна в нашем исследовании, так как статистически значимое повышение

уровня метилирования в промоторном участке гена MGMT зафиксировано в 50 % случаев с мутантным геном KRAS.

Для злокачественных новообразований в толстой и прямой кишке, характеризующихся наличием мутаций в гене KRAS и отсутствием или низким уровнем CIMP, в других исследованиях показано более благоприятное течение болезни с большей общей выживаемостью по сравнению с опухолями, несущими мутации в гене BRAF V600 и CIMP-фенотип [19]. В нашем исследовании были выделены группы KPP по признаку метастазирования – основного показателя прогрессирования заболевания. Основная доля активирующих мутаций в гене KRAS была идентифицирована в образцах KPP с метастазами в регионарные лимфоузлы (80 %). По одной SNP было обнаружено в других группах: KPP без метастазов и KPP с удаленными метастазами (табл. 4). Обращает внимание разный характер распределения в исследованной выборке событий гиперметилирования промоторных участков и активирующих мутаций в гене KRAS при отсутствии мутаций в гене BRAF. Выявленная тенденция указывает на возможность использования показателей уровня метилирования исследованных генов как маркеров прогрессирования KPP в случае опухолей, несущих мутацию в гене KRAS.

Заключение

Использование метода пиросеквенирования позволило продемонстрировать статистически достоверное увеличение уровня метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров APC, CDH13, MGMT в опухолях KPP по сравнению с образцами нормальной ткани в 40 56 и 32 % случаев соответственно. Уровень CpG-метилирования генов в нашем исследовании не коррелировал с возрастом и полом больных KPP.

Статус гиперметилирования по одному и более гену был зафиксирован во всех 10 образцах опухоли с мутациями в гене *KRAS*, однако не было обнаружено достоверной корреляции между этими показателями. Мутации в гене *KRAS* преобладали в тканях опухолей КРП с метастазами в регионарные лимфоузлы (67 % случаев $T_{3-4}N_1M_0$), а CpG-гиперметилирование от 1 до 3 исследованных генов было статистически достоверно ассоциировано с формированием как отдаленных метастаз ($\chi^2=6,52$, $p=0,017$), так и с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов ($\chi^2=6,39$, $p=0,019$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. Ростов н/Д: ООО «Ростгиздат», 2001. 256 с.
2. Одицова И.Н., Писарева Л.Ф., Хряпенов А.В. Эпидемиология злокачественных новообразований в мире // Сибирский онкологический журнал. 2015. № 5. С. 95–101.
3. Catalogue of somatic mutations in cancer – COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> 11.11.2015).
4. Chen J., Rocken C., Lofton-Day C., Schulz H.U., Muller O., Kutzner N., Malfertheiner P., Ebert M.P. Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis // *Carcinogenesis*. 2005. Vol. 26 (1). P. 37–43.
5. Ding Z.Y., Jiang T., Piao Y., Han T., Han Y.L., Xie X.D. Meta-analysis of the association between APC promoter methylation and colorectal cancer // *Onco Targets Ther*. 2015. Vol. 5 (8). P. 211–222. doi: 10.2147/OTT.S75827.
6. Esteller M. Molecular origins of cancer: epigenetics in cancer // *N. Engl. J. Med*. 2008. Vol. 358 (11). P. 1148–1096.
7. Grady W.M., Carethers J.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis // *Gastroenterology*. 2008. Vol. 135 (4). P. 1079–1099. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.076.
8. Hibi K., Nakao A. Lymph node metastasis is infrequent in patients with highly-methylated colorectal cancer // *Anticancer Res*. 2006. Vol. 26 (1A). P. 55–58.
9. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol*. 2013. Vol. 14 (10). R. 115.
10. Jass J.R. Colorectal cancer: a multipathway disease // *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2006. Vol. 12 (3–4). P. 273–287.
11. Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Gevorkyan Y.A., Soldatkina N.V. KRAS gene mutations and gender differences in colorectal cancer // *Int. J. Biomed*. 2015. Vol. 5 (1). P. 11–15.
12. Kim M.S., Lee J., Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer // *Cancer Metastasis Rev*. 2010. Vol. 29 (1). P. 181–206. doi: 10.1007/s10555-010-9207-6.
13. Kontic M., Stojisic J., Jovanovic D., Bunjevacki V., Ognjanovic S., Kuriger J., Puumala S., Nelson H.H. Aberrant promoter methylation of CDH13 and MGMT genes is associated with clinicopathological characteristics of primary non small cell lung carcinoma // *Clin. Lung Cancer*. 2012. Vol. 13 (4). P. 297–303. doi: 10.1016/j.clcc.2011.11.003.
14. Lof-Ohlin Z.M., Nilsson T.K. Pyrosequencing assays to study promoter CpG site methylation of the O6-MGMT, hMLH1, p14ARF, p16INK4a, RASSF1A, and APC1A genes // *Oncol. Rep*. 2009. Vol. 21 (3). P. 721–729.
15. Nagasaka T., Sasamoto H., Notohara K., Cullings H.M., Takeda M., Kimura K., Kambara T., MacPhee D.G., Young J., Leggett B.A., Jass J.R., Tanaka N., Matsubara N. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation // *Clin. Oncol*. 2004. Vol. 22 (22). P. 4584–4594.
16. Nakagawa H., Nuovo G.J., Zervos E.E., Martin E.W., Salvo-ara Jr.R., Aaltonen L.A., de la Chapelle A. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development // *Cancer Res*. 2001. Vol. 61 (19). P. 6991–6995.
17. Ogino S., Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer // *J. Mol. Diag*. 2008. Vol. 10 (1). P. 13–27. doi: 10.2353/jmol dx.2008.070082.
18. Patterson K., Molloy L., Qu W., Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis // *J. Vis. Exp*. 2011. Vol. 56. pii. 3170. doi: 10.3791/3170.
19. Phipps A.I., Limburg P.J., Baron J.A., Burnett-Hartman A.N., Weisenberger D.J., Laird P.W., Sinicrope F.A., Rosty C., Buchanan D.D., Potter J.D., Newcomb P.A. Association Between Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Patient Survival // *Gastroenterology*. 2015. Vol. 148 (1). P. 77–87. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.038.
20. Taniguchi H., Yamazaki K., Yoshino T., Muro K., Yatabe Y., Watanabe T., Ebi H., Ochiai A., Baba E., Tsuchihara K. Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS (KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients // *Cancer Sci*. 2015. Vol. 106 (3). P. 324–327. doi: 10.1111/cas.12595.
21. de Vogel S., Weijenberg M.P., Herman J.G., Wouters K.A., de Goeij A.F., van den Brandt P.A., de Bruine A.P., van Engeland M. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events // *Ann Oncol*. 2009. Vol. 20 (7). P. 1216–1222. doi: 10.1093/annonc/mdn782.
22. Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L. Genetic alterations during colorectal tumor development // *N. Engl. J. Med*. 1988. Vol. 319 (9). P. 525–532.

Поступила 22.12.15.
Принята в печать 10.02.16.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кит Олег Иванович, доктор медицинских наук, заслуженный врач РФ, профессор, директор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). SPIN-код: 1728-0329.

Водолажский Дмитрий Игоревич, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: dvodolazhsky@gmail.com. SPIN-код: 6660-5361.

Двадненко Константин Владимирович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: sarmatkv@gmail.com. SPIN-код: 4497-1769.

Олейников Денис Дамирович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: 110588h@mail.ru.

Олейникова Елена Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: lena_gudueva@mail.ru. SPIN-код: 5840-4093.

Ефимова Ирина Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: 9889966451i@gmail.com. SPIN-код: 1982-5034.

Тимошкина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: n_timoshkina@mail.ru. SPIN-код: 9483-4330

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

ABERRANT METHYLATION OF THE PROMOTER OF APC, CDH13 AND MGMT GENES IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

O.I. Kit, D.I. Vodolazhskiy, K.V. Dvadenko, I.I. Efimova, E.N. Oleynikova, D.D. Oleynikov, N.N. Timoshkina

Rostov Cancer Research Institute of the Ministry of Health, Rostov-on-Don
63, 14th line Street, 344037-Rostov-on-Don, Russia. E-mail: n_timoshkina@mail.ru

Abstract

Aberrant methylation of gene promoter regions is the main epigenetic change characterizing colorectal cancer. Methylation levels of 42 CpG-sites of promoter regions of the *MGMT*, *APC* and *CDH13* genes in colorectal cancer were studied in comparison with methylation levels of the adjacent normal tissue in 25 patients. Pyrosequencing showed an increase in methylation levels of promoter regions of the *MGMT*, *APC* and *CDH13* genes in tumor samples by 3 to 5 times. These tumor samples were screened for activating SNP-mutations in the *KRAS* (40 %), *NRAS* (0 %) and *BRAF* (0 %) oncogenes. SNP-mutations in the *KRAS* gene were accompanied by hypermethylation of one or more promoters of the studied genes. Association of this epigenetic index with tumor metastasis was proved. The data on an increase in methylation of the promoter regions of oncosuppressor genes can be used as sensitive prognostic markers of progression and metastasis of colorectal cancer.

Key words: CpG-methylation, colorectal cancer, *MGMT*, *APC*, *CDH13*, *CIMP*.

REFERENCES

1. Kornienko I.V., Vodolazhskiy D.I., Vejko V.P., Shherbakov V.V., Ivanov P.L. Preparation of biological material for molecular-genetic identification surveys at mass admission of unidentified bodies. Rostov-on-Don: «Rostizdat», 2001. 256 p. [in Russian]
2. Odintsova I.N., Pisareva L.F., Hryapenkov A.V. Epidemiology of malignant tumors in the world // Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2015. № 5. P. 95–101. [in Russian]
3. Catalogue of somatic mutations in cancer – COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> 11.11.2015).
4. Chen J., Rocken C., Lofton-Day C., Schulz H.U., Muller O., Kutzner N., Malfertheiner P., Ebert M.P. Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis // Carcinogenesis. 2005. Vol. 26 (1). P. 37–43.
5. Ding Z.Y., Jiang T., Piao Y., Han T., Han Y.L., Xie X.D. Meta-analysis of the association between APC promoter methylation and colorectal cancer // Onco Targets Ther. 2015. Vol. 5 (8). P. 211–222. doi: 10.2147/OTT.S75827.
6. Esteller M. Molecular origins of cancer: epigenetics in cancer // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 358 (11). P. 1148–1096.
7. Grady W.M., Carethers J.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis // Gastroenterology. 2008. Vol. 135 (4). P. 1079–1099. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.076.
8. Hibi K., Nakao A. Lymph node metastasis is infrequent in patients with highly-methylated colorectal cancer // Anticancer Res. 2006. Vol. 26 (1A). P. 55–58.
9. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // Genome Biol. 2013. Vol. 14 (10). R. 115.
10. Jass J.R. Colorectal cancer: a multipathway disease // Critical Reviews in Oncogenesis. 2006. Vol. 12 (3–4). P. 273–287.
11. Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Gevorkyan Y.A., Soldatkina N.V. KRAS gene mutations and gender differences in colorectal cancer // Int. J. Biomed. 2015. Vol. 5 (1). P. 11–15.
12. Kim M.S., Lee J., Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer // Cancer Metastasis Rev. 2010. Vol. 29 (1). P.181–206. doi: 10.1007/s10555-010-9207-6.
13. Kontic M., Stojic J., Jovanovic D., Bunjevacik V., Ognjanovic S., Kuriger J., Puumala S., Nelson H.H. Aberrant promoter methylation of CDH13 and MGMT genes is associated with clinicopathological characteristics of primary non small cell lung carcinoma // Clin. Lung Cancer. 2012. Vol. 13 (4). P. 297–303. doi: 10.1016/j.clcc.2011.11.003.
14. Lof-Ohlin Z.M., Nilsson T.K. Pyrosequencing assays to study promoter CpG site methylation of the O6-MGMT, hMLH1, p14ARF, p16INK4a, RASSF1A, and APC1A genes // Oncol. Rep. 2009. Vol. 21 (3). P. 721–729.
15. Nagasaka T., Sasamoto H., Notohara K., Cullings H.M., Takeda M., Kimura K., Kambara T., MacPhee D.G., Young J., Leggett B.A., Jass J. R., Tanaka N., Matsubara N. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation // Clin. Oncol. 2004. Vol. 22 (22). P. 4584–4594.
16. Nakagawa H., Nuovo G.J., Zervos E.E., Martin E.W., Salovara Jr.R., Aaltonen L.A., de la Chapelle A. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development // Cancer Res. 2001. Vol. 61 (19). P. 6991–6995.

17. Ogino S., Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer // *J. Mol. Diag.* 2008. Vol. 10 (1). P. 13–27. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070082.
18. Patterson K., Molloy L., Qu W., Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis // *J. Vis. Exp.* 2011. Vol. 56. pii. 3170. doi: 10.3791/3170.
19. Phipps A.I., Limburg P.J., Baron J.A., Burnett-Hartman A.N., Weisenberger D.J., Laird P.W., Sinicrope F.A., Rosty C., Buchanan D.D., Potter J.D., Newcomb P.A. Association Between Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Patient Survival // *Gastroenterology*. 2015. Vol. 148 (1). P. 77–87. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.038.
20. Taniguchi H., Yamazaki K., Yoshino T., Muro K., Yatabe Y., Watanabe T., Ebi H., Ochiai A., Baba E., Tsuchihara K. Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS (KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients // *Cancer Sci.* 2015. Vol. 106 (3). P. 324–327. doi: 10.1111/cas.12595.
21. de Vogel S., Weijnenberg M.P., Herman J.G., Wouters K.A., de Goeij A.F., van den Brandt P.A., de Bruine A.P., van Engeland M. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events // *Ann Oncol.* 2009. Vol. 20 (7). P. 1216–1222. doi: 10.1093/annonc/mdn782.
22. Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L. Genetic alterations during colorectal tumor development // *N. Engl. J. Med.* 1988. Vol. 319 (9). P. 525–532.

Received 22.12.15.

Accepted 10.02.16.

ABOUT THE AUTHORS

Kit Oleg I., MD, DSc, Professor, Director of the Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). SPIN-code: 1728-0329.

Vodolazhskij Dmitrij I., PhD, Head of Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: dvodolazhsky@gmail.com. SPIN-code: 6660-5361.

Dvadnenko Konstantin V., MD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: sarmatkv@gmail.com. SPIN-code: 4497-1769.

Olejnikov Denis D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: 110588h@mail.ru.

Olejnikova Elena N., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: lena_gudueva@mail.ru. SPIN-code: 5840-4093.

Efimova Irina Yu., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: 9889966451i@gmail.com. SPIN-code: 1982-5034.

Timoshkina Natal'ja N., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: n_timoshkina@mail.ru. SPIN-code: 9483-4330.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests