

Перспективные маркеры CIMP+ опухолей толстой кишки, выявленные на основе анализа данных ресурса TCGA

Г.С. Краснов, А.Д. Бениаминов, Р.А. Тычко, Г.А. Пузанов, Р.О. Новаковский, А.В. Кудрявцева, А.А. Дмитриев

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

CIMP+ (CpG-Island Methylator Phenotype) опухоли характеризуются плотным метилированием промоторных CpG-островков одновременно многих генов и представляют отдельную группу злокачественных новообразований толстой кишки. Несмотря на то что диагностика CIMP+ опухолей имеет значительную прогностическую ценность, до сих пор не разработано эффективного набора маркеров для их выявления. Для определения CpG-сайтов, уровень метилирования которых может быть использован для идентификации CIMP+ опухолей, с помощью созданного ранее приложения CrossHub нами проведен анализ профилей экспрессии и метилирования 297 образцов первичных опухолей и 38 парных к ним «условных норм» толстой кишки, представленных в базе проекта TCGA (The Cancer Genome Atlas). Разработан скоринг, учитывающий уровень метилирования CpG-сайтов, их расположение, а также уровень экспрессии соответствующих генов. Определено, что статус метилирования CpG-сайтов, относящихся к генам *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR*, является перспективным маркером CIMP+ опухолей. Более того, идентифицированы конкретные районы промоторных областей этих генов, уровень метилирования которых ассоциирован с исследуемым фенотипом. Для валидации полученных данных на независимой выборке, сначала оценили относительный уровень мРНК генов *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR* в 30 парных (опухоль/«условная норма») образцах толстой кишки методом количественной ПЦР. Для всех генов выявлено частое (50–60 % случаев) и значительное (2–30 раз) снижение экспрессии. Затем методом бисульфитной конверсии ДНК с последующим клонированием и секвенированием исследовали статус метилирования CpG-сайтов, отобранных в результате биоинформатического анализа, и обнаружили высокий уровень метилирования (β -value = 0.3–0.9) в образцах с одновременно сниженным уровнем экспрессии всех четырех генов и низкий уровень метилирования (β -value = 0.0–0.2) в образцах с неизменным уровнем экспрессии четырех генов и в «условных нормах». Таким образом, статус метилирования CpG-сайтов промоторных областей генов *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR* является перспективным потенциальным маркером CIMP+ опухолей толстой кишки.

Ключевые слова: рак толстой кишки; CIMP+; эпигенетика; метилирование ДНК; TCGA; количественная ПЦР; молекулярные маркеры.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Краснов Г.С., Бениаминов А.Д., Тычко Р.А., Пузанов Г.А., Новаковский Р.О., Кудрявцева А.В., Дмитриев А.А. Перспективные маркеры CIMP+ опухолей толстой кишки, выявленные на основе анализа данных ресурса TCGA. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):920-924. DOI 10.18699/VJ17.313

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Krasnov G.S., Beniaminov A.D., Tychko R.A., Puzanov G.A., Novakovskiy R.O., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A. Promising markers of CIMP+ colon tumors identified on the basis of TCGA data analysis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):920-924. DOI 10.18699/VJ17.313 (in Russian)

Received 11.09.2017
Accepted for publication 23.11.2017
© AUTHORS, 2017

e-mail: Alex_245@mail.ru

Promising markers of CIMP+ colon tumors identified on the basis of TCGA data analysis

G.S. Krasnov, A.D. Beniaminov, R.A. Tychko, G.A. Puzanov, R.O. Novakovskiy, A.V. Kudryavtseva, A.A. Dmitriev

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

CIMP+ (CpG-Island Methylator Phenotype) tumors are characterized by dense methylation of promoter CpG islands of many genes at once and represent a separate group of malignant neoplasms of the colon. Despite the fact that the diagnostics of CIMP+ tumors has a significant prognostic value, an effective set of markers has not been developed yet. For the identification of CpG sites, the methylation level of which could be used to detect CIMP+ tumors, an analysis of expression and methylation profiles of 297 primary colon tumors and 38 histologically normal tissues paired to them, which are presented in the TCGA (The Cancer Genome Atlas) project database, was performed by us using the CrossHub tool created previously. We developed the scoring, which takes into account the methylation level of CpG sites, their location, and the expression level of the corresponding genes. It was revealed that the methylation status of CpG sites of the *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134*, and *CHFR* genes is a promising marker of CIMP+ tumors. Moreover, specific regions of promoters of these genes, the methylation level of which was associated with the examined phenotype, were identified. To verify the obtained data in independent sampling, first, the quantitative PCR was used to assess the relative mRNA level of the *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134*, and *CHFR* genes in 30 paired (tumor/histologically normal tissue) colon samples. For all the genes, a frequent (50–60 % of cases) and significant (2–30-fold) expression decrease was revealed. Then, the bisulfite conversion of DNA followed by cloning and sequencing was applied to examine the methylation status of CpG sites that were selected as the result of bioinformatics analysis. We observed a high methylation level (β -value = 0.3–0.9) of the CpG sites in the samples with simultaneous downregulation of all 4 genes and a low methylation level (β -value = 0.0–0.2) in the samples with the unchanged expression level of 4 genes and in histologically normal tissues. Thus, the methylation status of the CpG sites of promoter regions of the *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134*, and *CHFR* genes is a promising potential marker of CIMP+ colon tumors.

Key words: colon cancer; CIMP+; epigenetics; DNA methylation; TCGA; quantitative PCR; molecular markers.

Фенотип CIMP+ (CpG island methylator phenotype) отражает особый тип онкогенеза, который проявляется в плотном гиперметиловании одновременно множества CpG-островков в регуляторных (чаще всего промоторных) областях генома (Rhee et al., 2017). Метилирование и последующая супрессия распространяются на такие гены, как *CDKN2A (p16)*, *MLH1* и др., которые в нормальных тканях метилированию не подвергаются (Barzily-Rokni et al., 2011). Впервые фенотип CIMP+ был обнаружен при раке толстой кишки (Toyota et al., 1999), но в последние годы данный термин все чаще используют для описания интенсивного гиперметилования промоторов генов и в других видах рака, включая рак легкого, молочной железы, мочевого пузыря, матки, желудка, яичника, поджелудочной железы, почек и предстательной железы (Suzuki et al., 2014). Проведенные нами ранее исследования нарушений паттернов метилирования генов хромосомы 3 с применением NotI-микрочипов позволили также предположить существование опухолей CIMP+ (20–30 % опухолей) при раке легкого, яичника, шейки матки и почки (Dmitriev et al., 2012, 2014; Kashuba et al., 2012; Senchenko et al., 2013). Молекулярные и клинико-патологические особенности этого типа опухолей позволяют считать, что возникновение различных CIMP+ опухолей обусловлено единым молекулярным механизмом (Suzuki et al., 2014). Однако причины, ответственные за образование данного фенотипа, пока не установлены.

Ранняя диагностика CIMP+ опухолей имеет значительную прогностическую ценность (Hughes et al., 2013). Кроме того, для некоторых видов рака показано, что CIMP+ опухоли проявляют чувствительность к деметилирующим препаратам и ингибиторам EZH2 (Suzuki et al., 2014). Необходимо персонализированное назначение препаратов на основе деметилирующих агентов, так как их нецелевое использование крайне опасно и может стимулировать прогрессию заболевания (Mani, Herceg, 2010). Основной целью большинства исследований является попытка установить наличие CIMP+ опухолей в конкретных видах рака. При этом наборы маркерных генов для определения данного фенотипа различаются в разных работах, что приводит к серьезным затруднениям при анализе результатов (Suzuki et al., 2014).

Целью нашего исследования было определение перспективных маркеров для диагностики CIMP+ опухолей толстой кишки на основе комплексного подхода, включающего анализ современных транскриптомных и метиломных баз данных (таких как TCGA – The Cancer Genome Atlas) и последующую экспериментальную валидацию на выборке первичных опухолей.

Материалы и методы

Биоинформатический анализ. С помощью разработанного ранее приложения CrossHub (Krasnov et al., 2016) был проведен анализ материалов проекта TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>) для 297 образцов первичных опухолей и 38 парных к ним гистологически нормальных тканей («условных норм») толстой кишки (Cancer Genome Atlas, 2012). Использовали данные о статусе метилирования ДНК, полученные с помощью микрочипов Infinium HumanMethylation450 (Illumina, США), и данные об уров-

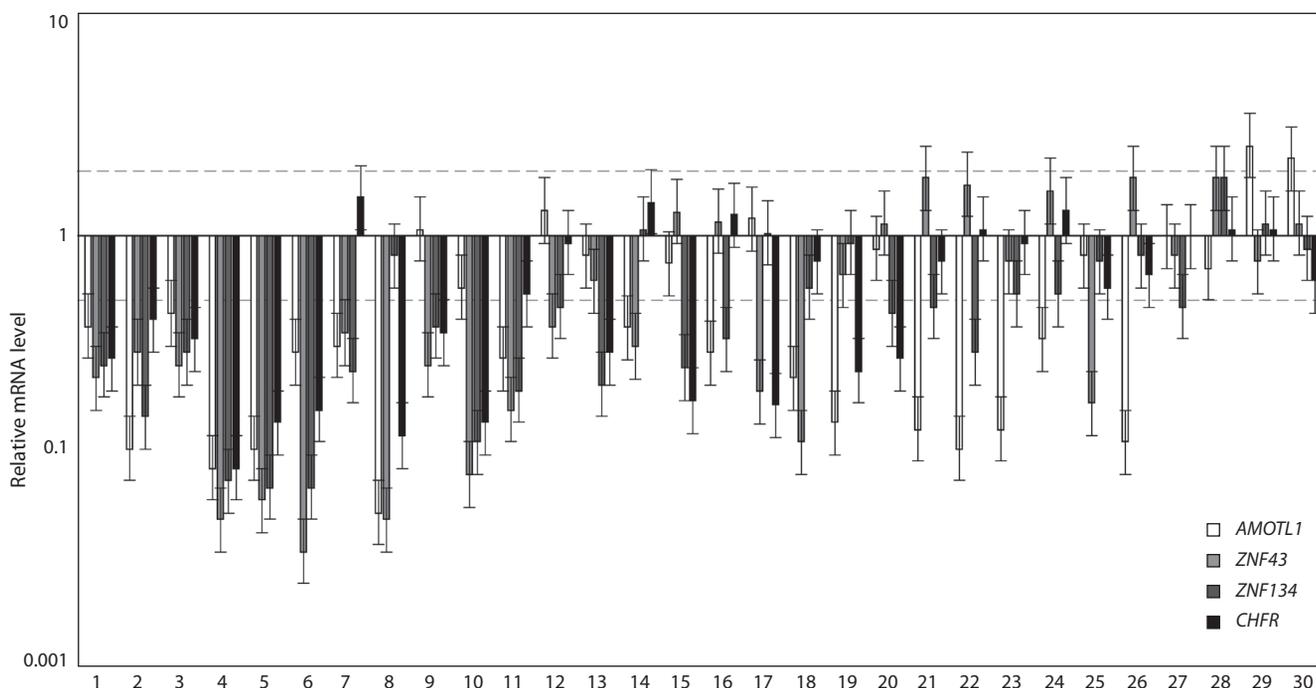
не экспрессии генов, полученные с помощью высокопроизводительных секвенаторов серии HiSeq (Illumina). Для установления ассоциации CpG-сайтов с промоторными областями генов воспользовались материалами проекта ENCODE для шести клеточных линий.

Образцы тканей. Операционные образцы опухолевых тканей толстой кишки и тканей «условной нормы» собраны и охарактеризованы в Московском научно-исследовательском онкологическом институте (МНИОИ) им. П.А. Герцена. Цели и осуществление данной работы одобрены этическим комитетом МНИОИ им. П.А. Герцена. Опухолевые клетки в каждом образце рака толстой кишки составляли не менее 70 %. Образцы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70 °С.

Выделение РНК, ДНК, получение кДНК. Замороженные в жидком азоте образцы опухолевых и парных к ним нормальных тканей толстой кишки подвергались механической гомогенизации на дисмембраторе Mikro-Dismembrator S (Sartorius, Германия). Для выделения РНК и ДНК использовали наборы RNeasy Mini Kit и QIAamp DNA Mini Kit (фирма Qiagen, Германия). Оценка количества РНК проводилась на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США), оценка качества – на биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Параметр RIN (RNA integrity number – показатель качества РНК) для образцов, включенных в исследования, составлял не менее 7. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Nanodrop, США). Качество выделенной ДНК проверяли электрофорезом в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия, а также по значению отношения 260/280 нм, которое составляло 1.8–2.0. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения реакции обратной транскрипции применяли обратную транскриптазу M-MuLV (Thermo Fisher Scientific) и набор случайных гексануклеотидов.

Количественная ПЦР (кПЦР). Для количественной оценки уровня мРНК целевых и контрольных генов использовали наборы праймер-зонд TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контрольных выбраны гены *RPNI* и *PUM1* (Krasnov et al., 2011). С учетом биологической вариабельности уровня мРНК контрольных генов, при оценке экспрессии целевых генов значимыми считали изменения в 2 раза и более. Количественную ПЦР проводили на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) в трех технических повторностях по протоколу, описанному нами ранее (Dmitriev et al., 2016). Данные кПЦР обрабатывали при помощи оригинального программного приложения АТГ (Melnikova et al., 2016). Относительный уровень мРНК оценивали методом относительных измерений ($\Delta\Delta Ct$ -метод) с учетом эффективности реакций, как описано ранее (Dmitriev et al., 2016).

Анализ метилирования промоторных областей целевых генов проводили методом бисульфитной конверсии ДНК с последующим клонированием и секвенированием по Сэнгеру. ДНК обрабатывали бисульфитом при помощи набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Продукты амплификации вырезали из 2 % агарозного геля и очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator-5



Relative levels of *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134*, and *CHFR* mRNAs in 30 colon cancer samples.

Quantitative PCR data are presented in the logarithmic scale. Dashed lines indicate the range of twofold mRNA level changes, and values within the range are considered the preservation of expression.

Methylation level of the selected CpG sites of the *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134*, and *CHFR* promoter regions in colon cancer samples

Gene	Number of CpG sites	Methylation level of CpG sites (β -value)		
		Tumor, samples 1–6	Tumor, samples 27–30	Conventional norm, samples 1–6, 27–30
<i>AMOTL1</i>	8	0.3–0.9	0.0–0.2	0.0–0.2
<i>ZNF43</i>	4	0.3–0.9	0.0–0.2	0.0–0.2
<i>ZNF134</i>	7	0.3–0.9	0.0–0.2	0.0–0.2
<i>CHFR</i>	6	0.3–0.9	0.0–0.2	0.0–0.2

лирования сайтов, статус метилирования которых может быть использован в качестве маркера CIMP+ опухолей толстой кишки (β -value = 0.3–0.9).

Диагностика CIMP+ опухолей толстой кишки необходима в силу ее высокой прогностической значимости (Lee et al., 2017), однако до сих пор нет унифицированного надежного набора маркеров, что вызывает существенные сложности при интерпретации результатов из различных исследований (Berg et al., 2014). В представленной работе проведен комплексный анализ данных ресурса TCGA, позволивший идентифицировать CpG-сайты, гиперметилирование которых функционально и ассоциировано с CIMP+ фенотипом опухолей толстой кишки. Полученный результат валидирован на независимой выборке первичных опухолей толстой кишки и парных к ним «условных норм». Таким образом, показано, что уровень метилирования CpG-сайтов промоторных областей генов *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR* является перспективным маркером CIMP+ опухолей толстой кишки. Для определения клинической значимости предложенных маркеров

необходимы дальнейшие масштабные исследования на первичных опухолях.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Moscow government, project 15-34-70055 mol_a_Mos. Experiments were performed at the Genome Shared Access Center, Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Barzily-Rokni M., Friedman N., Ron-Bigger S., Isaac S., Michlin D., Eden A. Synergism between DNA methylation and macroH2A1 occupancy in epigenetic silencing of the tumor suppressor gene p16(CDKN2A). *Nucleic Acids Res.* 2011;39(4):1326-1335. DOI 10.1093/nar/gkq994.

- Berg M., Hagland H.R., Soreide K. Comparison of CpG island methylator phenotype (CIMP) frequency in colon cancer using different probe- and gene-specific scoring alternatives on recommended multi-gene panels. *PloS ONE*. 2014;9(1):e86657. DOI 10.1371/journal.pone.0086657.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337. DOI 10.1038/nature11252.
- Couderc C., Boin A., Fuhrmann L., Vincent-Salomon A., Mandati V., Kieffer Y., Mechta-Grigoriou F., Del Maestro L., Chavrier P., Vallederand D., Brito I., Dubois T., De Koning L., Bouvard D., Louvard D., Gautreau A., Lallemand D. AMOTL1 promotes breast cancer progression and is antagonized by Merlin. *Neoplasia*. 2016;18(1):10-24. DOI 10.1016/j.neo.2015.11.010.
- Derks S., Cleven A.H., Melotte V., Smits K.M., Brandes J.C., Azad N., van Criekinge W., de Bruine A.P., Herman J.G., van Engeland M. Emerging evidence for CHFR as a cancer biomarker: from tumor biology to precision medicine. *Cancer Metastasis Rev*. 2014;33(1):161-171. DOI 10.1007/s10555-013-9462-4.
- Dmitriev A.A., Kashuba V.I., Haraldson K., Senchenko V.N., Pavlova T.V., Kudryavtseva A.V., Anedchenko E.A., Krasnov G.S., Pronina I.V., Loginov V.I., Kondratieva T.T., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Yenamandra S.P., Ignatjev I., Ernberg I., Klein G., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*. 2012;7(5):502-513. DOI 10.4161/epi.19801.
- Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Rozhmina T.A., Kishlyan N.V., Zyablitsin A.V., Sadritdinova A.F., Snezhkina A.V., Fedorova M.S., Yurkevich O.Y., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Glutathione S-transferases and UDP-glycosyltransferases are involved in response to aluminum stress in flax. *Front. Plant Sci*. 2016;7:1920. DOI 10.3389/fpls.2016.01920.
- Dmitriev A.A., Rudenko E.E., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Gordiyuk V.V., Melnikova N.V., Stakhovskiy E.O., Kononenko O.A., Pavlova L.S., Kondratieva T.T., Alekseev B.Y., Braga E.A., Senchenko V.N., Kashuba V.I. Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma. *BioMed Res. Int*. 2014;2014:735292. DOI 10.1155/2014/735292.
- Hughes L.A., Melotte V., de Schrijver J., de Maat M., Smit V.T., Bovee J.V., French P.J., van den Brandt P.A., Schouten L.J., de Meyer T., van Criekinge W., Ahuja N., Herman J.G., Weijenberg M.P., van Engeland M. The CpG island methylator phenotype: what's in a name? *Cancer Res*. 2013;73(19):5858-5868. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-12-4306.
- Jen J., Wang Y.C. Zinc finger proteins in cancer progression. *J. Biomed. Sci*. 2016;23(1):53. DOI 10.1186/s12929-016-0269-9.
- Kashuba V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Pavlova T., Ignatjev I., Gordiyuk V.V., Gerashchenko A.V., Braga E.A., Yenamandra S.P., Lerman M., Senchenko V.N., Zabarovsky E. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2012;13(10):13352-13377. DOI 10.3390/ijms131013352.
- Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Melnikova N.V., Zaretsky A.R., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Senchenko V.N., Kudryavtseva A.V. CrossHub: a tool for multi-way analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) in the context of gene expression regulation mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(7):e62. DOI 10.1093/nar/gkv1478.
- Krasnov G.S., Oparina N.Y., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V., Anedchenko E.A., Kondrat'eva T.T., Zabarovsky E.R., Senchenko V.N. *RPNI*, a new reference gene for quantitative data normalization in lung and kidney cancer. *Mol. Biol*. 2011;45(2):211-220. DOI 10.1134/S0026893311020129.
- Lee M.S., Menter D.G., Kopetz S. Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes. *J. Natl. Compr. Canc. Netw*. 2017;15(3):411-419.
- Mani S., Herceg Z. DNA demethylating agents and epigenetic therapy of cancer. *Adv. Genet*. 2010;70:327-340. DOI 10.1016/B978-0-12-380866-0.60012-5.
- Melnikova N.V., Dmitriev A.A., Belenikin M.S., Koroban N.V., Spersanskaya A.S., Krinitsina A.A., Krasnov G.S., Lakunina V.A., Snezhkina A.V., Sadritdinova A.F., Kishlyan N.V., Rozhmina T.A., Klimina K.M., Amosova A.V., Zelenin A.V., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V. Identification, expression analysis, and target prediction of flax genotroph microRNAs under normal and nutrient stress conditions. *Front. Plant Sci*. 2016;7:399. DOI 10.3389/fpls.2016.00399.
- Rhee Y.Y., Kim K.J., Kang G.H. CpG island methylator phenotype-high colorectal cancers and their prognostic implications and relationships with the serrated neoplasia pathway. *Gut Liver*. 2017;11(1):38-46. DOI 10.5009/gnl15535.
- Sanbhnani S., Yeong F.M. CHFR: a key checkpoint component implicated in a wide range of cancers. *Cell. Mol. Life Sci*. 2012;69(10):1669-1687. DOI 10.1007/s00018-011-0892-2.
- Senchenko V.N., Kisseljova N.P., Ivanova T.A., Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Kudryavtseva A.V., Panasenko G.V., Tsitrin E.B., Lerman M.I., Kissel'ov F.L., Kashuba V.I., Zabarovsky E.R. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics*. 2013;8(4):409-420. DOI 10.4161/epi.24233.
- Suzuki H., Yamamoto E., Maruyama R., Niinuma T., Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014;455(1-2):35-42. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.07.007.
- Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M., Herman J.G., Baylin S.B., Issa J.P. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(15):8681-8686.
- Zheng Y., Vertuani S., Nystrom S., Audebert S., Meijer I., Tegnebratt T., Borg J.P., Uhlen P., Majumdar A., Holmgren L. Angiomotin-like protein 1 controls endothelial polarity and junction stability during sprouting angiogenesis. *Circ. Res*. 2009;105(3):260-270. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.109.195156.