

В. Н. Запорожан, В. В. Бубнов, В. Г. Маричереда,
Ю. Ю. Петровский, Д. Ю. Андронов, Й. Хохайсель¹

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА *SFRP5* ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина,

¹ DKFZ, Funktionelle Genomanalyse, D-69120, Neuenheimer Feld 580, Heidelberg

УДК 616-006.6:618.19:575.164

В. Н. Запорожан, В. В. Бубнов, В. Г. Маричереда, Ю. Ю. Петровский, Д. Ю. Андронов,
Й. Хохайсель¹

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА *SFRP5* ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина,

¹ DKFZ, Funktionelle Genomanalyse, D-69120, Neuenheimer Feld 580, Heidelberg

Метилирование генов играет важную роль в развитии опухолевых заболеваний. Одним из количественных методов оценки содержания метилированной ДНК в тканях опухолей может быть пиросеквенирование.

Целью данного исследования была разработка пиросеквенирования для оценки метилирования ДНК гена *SFRP5* в опухолях рака молочной железы. Анализ метилирования был проведен методом количественного пиросеквенирования с использованием прибора PSQ96 ID фирмы Qiagen.

Установлено, что для определения содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах ткани аденокарциномы молочной железы можно использовать метод пиросеквенирования. Метод дает количественную оценку содержания метилированной ДНК в пробе ткани рака молочной железы. Содержание метилированной ДНК у больных раком молочной железы составляло $(35,96 \pm 2,23) \%$, тогда как в образцах условно нормальной ткани молочной железы — $(6,00 \pm 1,34) \%$ ($p \leq 0,001$).

Ключевые слова: метилирование ДНК, ген *SFRP*, CG сайт, аденокарцинома.

UDC 616-006.6:618.19:575.164

V. N. Zaporozhan, V. V. Bubnov, V. G. Marichereda, Yu. Yu. Petrovsky, D. Yu. Andronov,
Y. Hohaytsel¹

EPIGENETIC INACTIVATION OF GENE *SFRP5* AT BREAST CANCER

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine,

¹ DKFZ, Funktionelle Genomanalyse, D-69120, Neuenheimer Feld 580, Heidelberg

Genes methylation plays an important role in the development of cancer. Pyrosequencing technology is one of the methods of quantitative evaluation of methylated DNA level in the tumor tissue.

The aim of this study is to develop pyrosequencing to analyze *SFRP5* gene methylation in breast cancer. It was performed by quantitative pyrosequencing using the device PSQ96 ID (Qiagen).

Results. It was found that pyrosequencing method may be used to evaluate the level of of *SFRP5* gene methylated DNA in the adenocarcinoma samples. The method quantifies the level of methylated DNA in breast cancer samples. The methylation level of *SFRP5* gene in breast cancer sample was $(35.96 \pm 2.23)\%$, whereas the level of methylated DNA in normal breast tissue $(6.0 \pm 1.0)\%$ ($p \leq 0.001$).

Key words: DNA methylation, gene *SFRP*, CG site, adenocarcinoma.

Гены *SFRP*-семейства являются ингибиторами активации *Wnt*-регуляторного каскада. Эпигенетическая инактивация этих генов приводит к активации опухолевого роста в эксперименте [1; 2]. Ген *SFRP5*, взятый нами для оценки возможности использования его как диагностического маркера риска развития рака молочной железы (РМЖ), относится к этой группе генов-супрессоров *Wnt*-пути. Изучение метилирования гена *SFRP5* в оценке прогноза выживаемости при РМЖ показало, что наличие в опухоли метилированной ДНК

промотора гена *SFRP5* было связано с плохой выживаемостью пациентов [3]. Также в работе Н. Suzuki было выявлено метилирование промотора гена *SFRP5* в 75 % случаев у больных РМЖ [4]. В перечисленных выше работах изучение метилирования проводилось метилспецифической полимеразной цепной реакцией (ПЦР), которая не дает возможности определять количество метилированной по CG сайтам ДНК в образце опухоли — она оценивает метилирование по принципу «есть» или «нет». Нами

же было проведено количественное определение содержания метилированной ДНК по 4 CG сайтам в промоторе гена *SFRP5* с использованием технологии пиросеквенирования. Метод количественной оценки содержания метилированной (КОСМет) ДНК позволяет оценить количество метилированной и неметилированной ДНК в образце опухоли.

Цель работы — определение возможности использования метода КОСМет ДНК гена *SFRP5* в опухоли как диагностического маркера для диагно-



стики и прогноза риска развития РМЖ.

Материалы и методы исследования

Исследование метилирования гена *SFRP5* проводилось на биопсийном материале 26 образцов аденокарциномы молочной железы и 26 образцов неизмененной ткани молочной железы от этих же больных (условно нормальная ткань). Также в качестве контроля были взяты 6 образцов нормальной ткани молочной железы и 16 образцов ткани от больных с доброкачественными процессами молочной железы. Геномная ДНК была выделена с помощью наборов GeneJET DNA Purification Kit (Thermo scientific). Бисульфитная обработка геномной ДНК выполнялась согласно протоколу к набору EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). После бисульфитной обработки выделенной ДНК была проведена амплификация методом TouchDown ПЦП с HotStartTag DNA Polymerase с использованием набора Fermentas Maxima Hot Start PCR Master Mix PCR kit (Thermo scientific) и 5 пмоль специфических паймеров: 95 °C — 15 мин; 10 циклов 95 °C — 30 с, 65 °C — 1 мин, со снижением температуры на 1 °C на цикл, 30 циклов 95 °C — 30 с, 60 °C — 30 с, 72 °C — 45 с; 72 °C — 10 мин.

Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы MethylPrimer Express v 1.0.

Пиросеквенирование проводилось согласно протоколу. Сначала выполняли разделение цепей ДНК ампликона с помощью магнитных бус, нагруженных стрептовидином, далее цепь ДНК с биотином денатурировали в растворе щелочи, промывали буфером и добавляли в 96-луночный планшет, содержащий 10 пмоль секвенирующего праймера в буфере для отжига, выдерживали 2 мин при 80 °C и проводили пиросеквенирование.

Количественный анализ метилирования осуществляли на пиросеквенаторе PyroMark Q96 MD и PyroMark Q24 MDX с программой Pyro Q-Cp software. Программа автоматически высчитывает степень метилирования CpG островков в пробе и показывает его в процентах для каждого сайта метилирования. Полученные данные для вычисления параметров специфичности и чувствительности метода были обработаны с помощью программы MEDCALC.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение эпигенетических процессов регуляции эмбрионального развития, роста, старения и их нарушений, приводящих к возникновению различ-

ных заболеваний, в том числе и онкологических, имеет большое значение в понимании механизмов онкогенеза. Одним из быстрых количественных методов для анализа абберантного метилирования ДНК является пиросеквенирование.

На рис. 1 и 2 представлены результаты определения содержания метилированной ДНК гена *SFRP5*, а также показана степень метилирования цитозина в ДНК в пробе для каждого CG сайта метилирования в образцах ткани аденокарциномы молочной железы и в образцах нормальной ткани. Содержание метилированных CG сайтов первого экзона гена *SFRP5* в образцах нормальной ткани молочной железы составляет в среднем (6,00±1,34) %, в образцах условно нормальной ткани, взятой у больных РМЖ, в среднем (14,46±1,00) %. Таким образом, в условно нормальной ткани, взятой от больных РМЖ, уровень метилированной ДНК был достоверно выше ($p=0,051$), чем в здоровой ткани молочной железы (табл. 1, рис. 3).

В образцах тканей с фибroadеномой молочной железы суммарное содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* составило (10,00±1,03) %. При РМЖ суммарный уровень метилированной ДНК гена *SFRP5* в среднем составлял (35,96±

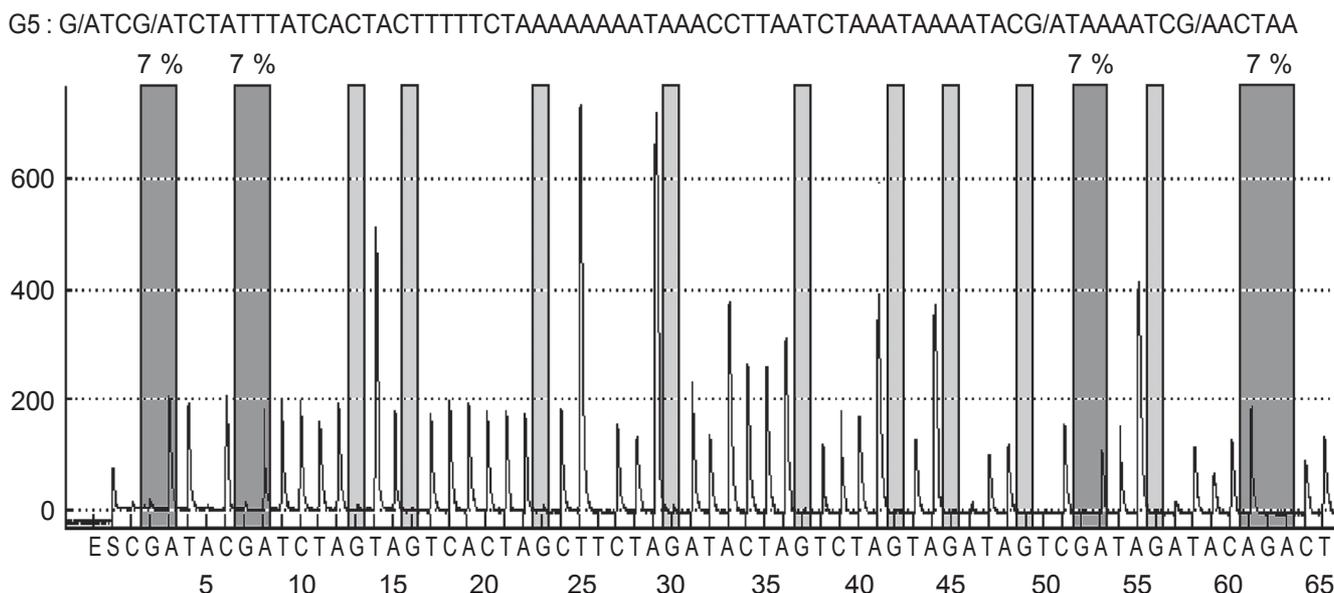


Рис. 1. Метилирование промотора гена *SFRP5* в нормальной ткани молочной железы

G3 : G/ATCG/ATCTATTTATCACTACTTTTTCTAAAAAATAAACCTTAATCTAAATAAAATACG/ATAAAATCG/AACTAA

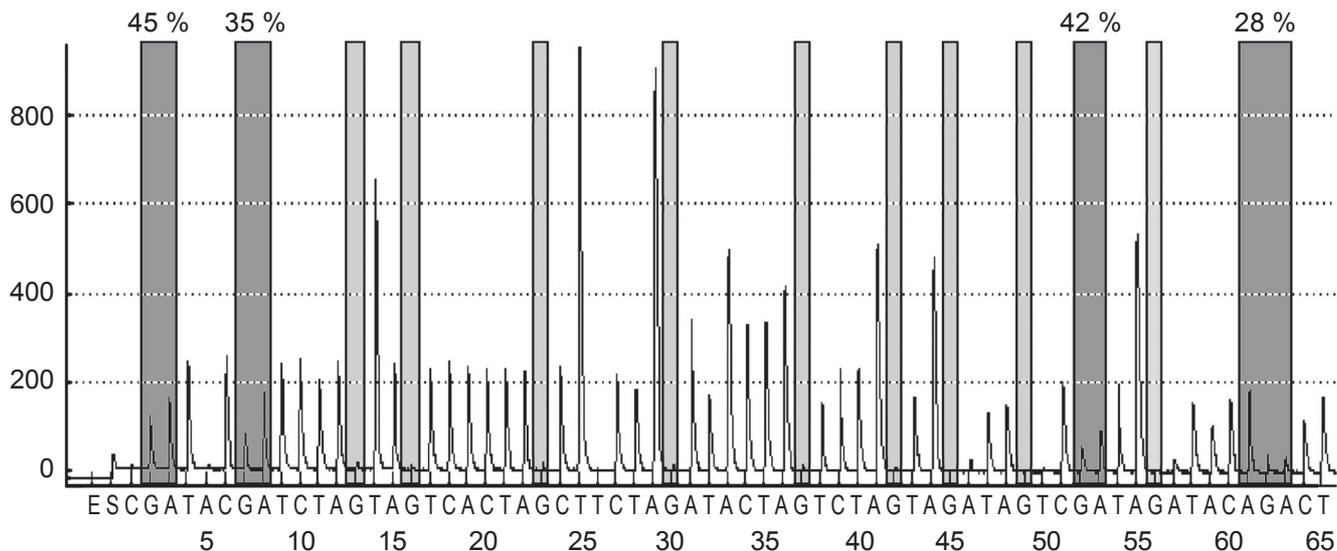


Рис. 2. Метилирование промотора гена *SFRP5* при аденокарциноме молочной железы

$\pm 2,23$ %), что достоверно выше, чем в образцах нормальной ткани ($p \leq 0,001$) и в образцах ткани с фиброаденомой молочной железы ($p \leq 0,001$, см. табл. 1).

Нами проведен сравнительный анализ значений содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* при аденокарциноме молочной железы и в нормальной ткани, условно нормальной ткани молочной железы и ткани с фиброаденомой молочной железы (см. рис. 3). Как было описано вы-

ше, содержание метилированной ДНК в образцах здоровой ткани и в образцах фиброаденомы молочной железы достоверно выше, чем в здоровой ткани молочной железы, что является важным. Высокое содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* в условно нормальной ткани и в ткани фиброаденомы молочной железы может, с одной стороны, свидетельствовать о «готовности» к неопластической трансформации, а с другой —

служить важным прогностическим критерием. Определение порога уровня метилирования этого гена в образцах с предраковыми заболеваниями молочной железы может быть прогностическим критерием возможной опухолевой трансформации доброкачественных опухолей молочной железы.

Оценка по ROC-кривой чувствительности метода детекции уровня метилированной ДНК гена *SFRP5* в суммарной группе норма + фиброаденома

Таблица 1
Сравнительный анализ содержания метилированной ДНК в образцах ткани рака молочной железы в сравнении с нормальной, условно нормальной тканью и специфичности и чувствительности метода количественной оценки содержания метилированной ДНК

Группа	Метилирование, %	p			
		1	2	3	4
1. Здоровые	6,00 ± ±1,34	—	0,743	0,05	<0,001
2. Фиброаденома	10,00 ± ±1,03	0,743	—	0,320	<0,001
3. Условно здоровая ткань	14,46 ± ±1,00	0,051	0,320	—	<0,001
4. Ткань РМЖ	35,96 ± ±2,23	<0,001	<0,001	<0,001	—

Примечание. ANOVA: $p < 0,001$; $F = 53,79$; $\eta^2 = 0,72$.

% метилированной ДНК

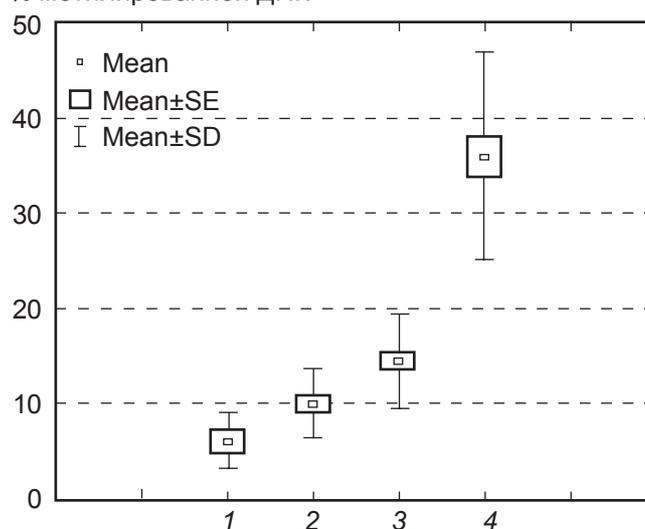


Рис. 3. Оценка содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* в ткани рака молочной железы (4) в сравнении с условно нормальной тканью (3) и фиброаденомой молочной железы (2): 1 — нормальная ткань



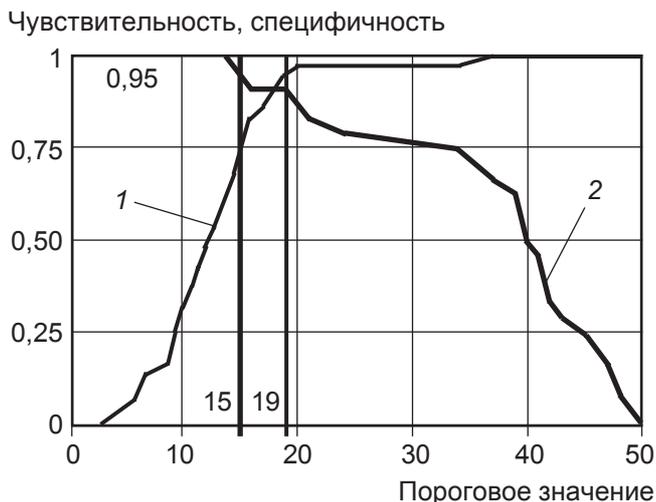


Рис. 4. Оценка порогового значения для содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах ткани от группы норма + фиброаденома + условная норма ($p=0,95$) в сравнении с раком молочной железы: 1 — специфичность; 2 — чувствительность

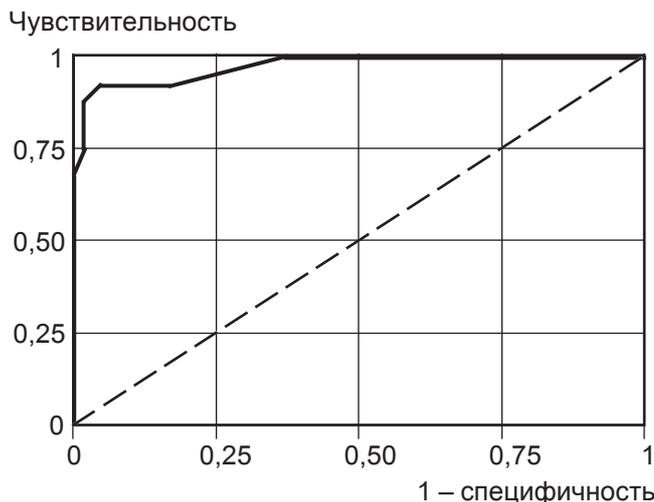


Рис. 5. Соотношение чувствительности и специфичности содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах ткани рака молочной железы в сравнении с группой норма + фиброаденома + условная норма

+ условная норма в сравнении с РМЖ лежит в области 15–19 % (рис. 4). Таким образом, в группе относительного риска, в которую мы включили три группы: норма + фиброаденома + условная норма от больных РМЖ, — уровень метилированной ДНК в ткани находится в пределах 0–19 %.

Оценка чувствительности и специфичности количественного определения содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* при РМЖ методом пиросеквенирования (по ROC-кривой) составила 83 и 99 % соответственно в сравнении с группой норма + фиброаденома + условная норма (рис. 5).

Таким образом, определение содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах нормальной ткани и ткани с доброкачественными и предраковыми заболеваниями может служить диагностическим и прогностическим маркером для ранней диагностики и оценки риска малигнизации доброкачественных процессов молочной железы. Содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* в опухолевой ткани выше 19 % может быть прогностическим критерием, требующим постоянного наблюдения за пациентами с предраковыми заболеваниями молочной железы.

Выводы

1. При анализе содержания метилированной ДНК CG сайтов гена *SFRP5* выявлен высокий ее уровень в образцах ткани аденокарциномы молочной железы — $(35,96 \pm 2,23)$ %, который был достоверно выше, чем в нормальной ткани молочной железы, взятой от этих же больных, — $(14,46 \pm 1,00)$ % ($p \leq 0,001$).

2. Содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах ткани аденокарциномы молочной железы — $(35,96 \pm 2,23)$ было достоверно выше, чем в образцах фиброаденомы молочной железы ($p \leq 0,001$) и условно нормальной ткани молочной железы ($p \leq 0,001$).

3. Критический уровень содержания метилированной ДНК гена *SFRP5*, определенный методом КОСМет, находится в пределах 15–19 %.

4. Чувствительность и специфичность КОСМет в оценке содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* при РМЖ методом пиросеквенирования составили 83 и 99 % соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Verschuur-Maes A. H. Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer / A. H. Verschuur-Maes, P. C. de Bruin, P. J. van Diest // *Breast Cancer Res*

Treat. — 2012, Dec. — Vol. 136 (3). — P. 705–715.

2. Promoter methylation of *sFRP5* in patients with ovarian clear cell adenocarcinoma / C. M. Ho, H. C. Lai, S. H. Huang [et al.] // *Eur J Clin Invest*. — 2010, Apr. — Vol. 40 (4). — P. 310–318.

3. Veeck J. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (*SFRP5*) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis / J. Veeck, C. Geisler, E. Noetzel // *Carcinogenesis*. — 2008, May. — Vol. 29 (5). — P. 991–998.

4. Suzuki H. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer / H. Suzuki, M. Toyota, H. Carraway // *Br. J. Cancer*. — 2008, Mar 25. — Vol. 98 (6). — P. 1147–1156.

REFERENCES

1. Verschuur-Maes A.H., de Bruin P.C., van Diest P.J. Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012, Dec; 136 (3): 705-715.

2. Ho C.M., Lai H.C., Huang S.H., Chien T.Y., Lin M.C., Chang S.F. Promoter methylation of *sFRP5* in patients with ovarian clear cell adenocarcinoma. *Eur J Clin Invest* 2010, Apr; 40 (4): 310-318.

3. Veeck J., Geisler C., Noetzel E. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (*SFRP5*) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* 2008, May; 29 (5): 991-998.

4. Suzuki H., Toyota M., Carraway H. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br. J. Cancer* 2008, Mar 25; 98 (6): 1147-1156.

Поступила 22.09.2014

