

# Анализ эпигенетической модификации гена супрессора опухолевого роста *DKK4* методом количественного пиросеквенирования при аденокарциноме грудной железы

**В.Н. Запорожан, В.В. Бубнов, В.Г. Маричереда, Ю.Ю. Петровский, Д.Ю. Андронов**  
Одесский национальный медицинский университет

Целью данного исследования была оценка значимости количественного определения гиперметилирования первого экзона гена *DKK4* в качестве биомаркера опухолевой трансформации эпителиальных клеток грудной железы больных аденокарциномой 2–3-й стадии. Анализ метилирования был проведен методом количественного пиросеквенирования с использованием набора PSQ96MA фирмы Qiagen. Содержание метилированной ДНК при раке грудной железы в среднем составил  $36,8 \pm 12,63\%$ , тогда как в образцах условно нормальной ткани грудной железы –  $19,37 \pm 7,1\%$ ,  $p \leq 0,01$ . Из 23 образцов ткани аденокарциномы грудной железы высокий уровень содержания метилированной ДНК первого экзона гена *DKK4* был выявлен в 20 образцах ( $86,96\%$ ,  $p \leq 0,01$ ); в 3 образцах уровень метилированной ДНК был сопоставим с содержанием в образцах условно нормальной ткани. Полученный результат позволяет рекомендовать данный метод как биомаркер для ранней диагностики аденокарциномы.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, ген *DKK4*, CG-сайт, аденокарцинома грудной железы.

Метилирование ДНК признано фундаментальным эпигенетическим механизмом, который необходим для нормального эмбрионального развития, регуляции деления клеток, дифференцировки, апоптоза, при этом неправильное гипер- или гипометилирование ДНК может приводить к ряду генетических заболеваний, включая новообразования [1, 2, 9, 13]. Метилирование цитозина, за которым следует гуанин (метилирование CpG), является наиболее широко исследованной эпигенетической модификацией в организме человека [7, 14]. Оценка роли метилирования в «молчании» генов и геномной нестабильности пристально изучается в течение последних лет [1, 6].

Метилирование цитозина в первом экзоне генов приводит к их инактивации путем блокирования транскрипции. При скрининге клеточных линий колоректального рака и колоректальных карцином была показана высокая частота одновременного метилирования всех генов семейства *SFRP* [1]. Было также доказано, что потеря функции генов *SFRP* при их метилировании сопровождалось активацией *Wnt*-сигнального пути в клеточных линиях колоректального рака. Гены *DKK*-семейства также являются ингибиторами активации *Wnt*-регуляторного каскада и тормозят рост опухолей. Эпигенетическая инактивация этих генов приводит к активации опухолевого роста в эксперименте [3, 4].

Изучение роли эпигенетической модификации первого экзона гена *DKK4* может быть интересна для оценки возможности использования метилирования этого гена в диагностике и прогнозе течения рака грудной железы.

**Цель исследования:** оценка значимости количественного определения гиперметилирования первого экзона гена

*DKK4* в качестве биомаркера опухолевой трансформации эпителиальных клеток грудной железы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

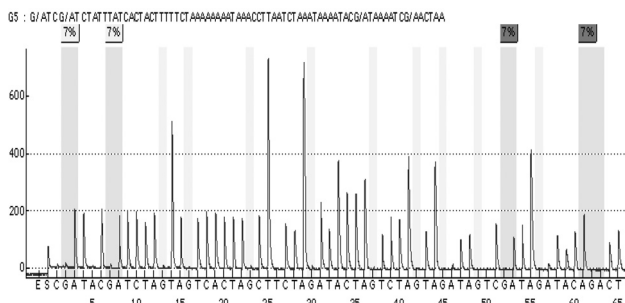
В группу исследования вошли 23 женщины с подтвержденным диагнозом аденокарциномы грудной железы 2–3-й стадии, которые были комплексно обследованы в соответствии с требованиями действующих клинических протоколов, регламентированных приказами МЗ Украины (№ 582 от 15.12.2003 и № 676 от 31.12.2004). Обследование проведено на клинических базах кафедры акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета. Все женщины, включенные в исследование, дали информированное согласие.

Исследование метилирования генов *DKK4* проводили на биопсийном материале 23 образцов аденокарциномы грудной железы и 22 образцов неизменной ткани грудной железы от этих же больных. Геномная ДНК была выделена с помощью наборов GeneJET DNA Purification Kit (Thermo scientific, USA). Бисульфитная обработка геномной ДНК была выполнена согласно протоколу к набору EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Germany). После бисульфитной обработки выделенной ДНК была проведена амплификация методом TouchDown ПЦП с HotStartTag DNA Polymerase. Для амплификации использовали набор Fermentas Maxima Hot Start PCR Master Mix PCR kit (Thermo scientific, USA) и 5 пкмоль специфических праймеров:  $95^\circ\text{C} - 15 \text{ мин}$ , 10 циклов –  $95^\circ\text{C} - 30 \text{ с}$ ,  $65^\circ\text{C} - 1 \text{ мин}$ , со снижением температуры на  $1^\circ\text{C} / \text{цикл}$ ; 40 циклов –  $94^\circ\text{C} - 30 \text{ с}$ ,  $60^\circ\text{C} - 45 \text{ с}$ ,  $72^\circ\text{C} - 45 \text{ с}$ ;  $72^\circ\text{C} - 10 \text{ мин}$ . Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы MethylPrimer Express v 1.0 (Applied Biosystems, USA).

Анализ метилирования был проведен методом количественного пиросеквенирования с использованием набора PSQ96MA фирмы Qiagen и 10 пкмоль специфических секвенирующих праймеров к первому экзону гена *DKK4* согласно методики (Qiagen, Germany). Количественный анализ метилирования проводили на пиросеквенаторе PyroMark Q96 MD и PyroMark Q24 MDX с программой Pyro Q-CpG Software (Qiagen, Germany). Программа автоматически высчитывает степень метилирования CpG сайтов в пробе и показывает его в процентах для каждого сайта метилирования. Данные были обработаны методами непараметрической статистики по Фридману.

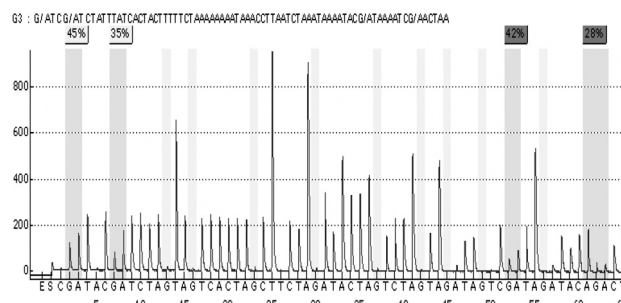
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение эпигенетических механизмов регуляции развития, роста и старения, а также нарушение этих механизмов, приводящее к возникновению различных заболеваний, в том числе онкологических, имеет большое значение в понимании механизмов онкогенеза. Для оценки возможности



**Рис. 1. Содержание метилированных CG-сайтов в первом экзоне гена DKK4 в образце неизменной ткани грудной железы**

Примечание: процент метилированной ДНК в CG- (или GT для комплементарной цепи) сайтах указан сверху графика



**Рис. 2. Содержание метилированных CG-сайтов в первом экзоне гена DKK4 в образце ткани аденокарциномы грудной железы**

Примечание: процент метилированной ДНК в CG- (или GT для комплементарной цепи) сайтах указан сверху графика

использования метилирования гена *DKK4* как диагностического маркера, было проведено изучение содержания метилированной ДНК этого гена в образцах ткани, полученной от больных раком грудной железы и условно нормальной ткани грудной железы, взятой от этих же больных.

В первом экзоне гена *DKK4* имеются четыре CG-сайта, в которых метилируется цитозин при раке грудной железы. На рис. 1 и 2 представлены результаты определения уровня метилирования гена *DKK4* методом пиросеквенирования. На представленных рисунках показано содержание метилированной ДНК для каждого CG-сайта гена *DKK4* в образце ткани аденокарциномы грудной железы и в условно нормальной ткани.

Содержание метилированной ДНК первого экзона гена *DKK4* в образцах ткани аденокарциномы грудной железы значительно выше, чем в образцах неизменной ткани грудной железы, взятых от этих же больных. Так, содержание метилированной ДНК при раке грудной железы в среднем составило  $36,8 \pm 12,63\%$ , тогда как в образцах условно нормальной ткани грудной железы – составил  $19,37 \pm 7,1\%$ , с достоверностью  $p \leq 0,01$ . Из 23 образцов ткани аденокарциномы грудной железы высокий уровень содержания метилированной ДНК первого экзона гена *DKK4* был выявлен в 20 образцах ( $86,96\%$ ,  $p \leq 0,01$ ); в 3 образцах уровень метилированной ДНК был сопоставим с содержанием в образцах условно нормальной ткани. Низкий уровень содержания метилированной ДНК гена *DKK4* был выявлен в 21 образце неизменной ткани грудной железы, в двух образцах из 23 – содержание метилированной ДНК было сравнимо с таковым в образцах ткани рака грудной железы ( $34\%$  и  $35\%$ ).

На рис. 3 представлен усредненный анализ сравнения содержания метилированной ДНК гена *DKK4* в образцах аденокарциномы и неизменной ткани грудной железы. Оценка чувствительности и специфичности количественной оценки содержания метилированной ДНК гена *DKK4* при раке грудной железы, рассчитанная с помощью программы MedCalc, составила  $86,9\%$  и  $91,3\%$  соответственно.

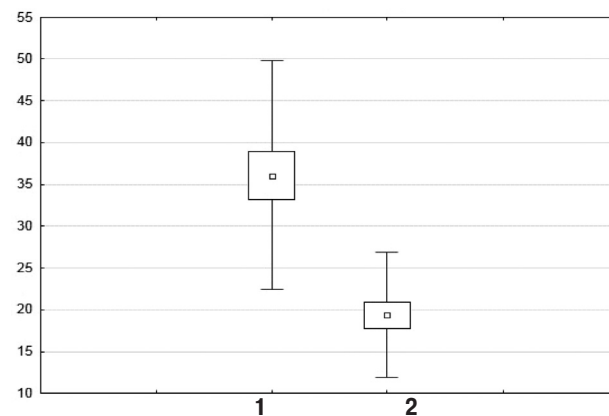
Wnt/beta-catenin клеточный регуляторный путь является необходимым для нормального эмбрионального развития и дифференцировки клеток. Аберрантная активация этого пути приводит к блокировке апоптоза, дифференцировки клеток, повышению митотического индекса [4, 7]. Функционирование Wnt пути связано с ключевым эффектором – бета-катенином. В неактивном состоянии цитоплазматический бета-катенин подвергается фосфорилированию и последующей деградации в протеосомах. Активация Wnt регуляторного пути связана с взаимодействием факторов роста Wnt с мембранным рецептором (семейство Frizzled рецепторов), препятствуя тем самым деградации бета-катенина. Транслокация последнего в ядро и взаимодействие с тран-

скрипционными факторами приводит к активации генов-мишеней, функция которых связана с активацией пролиферации (Cycline, C-мус и др). Гены *DKK1,2,3,4*, *WIF1* предотвращают индукцию сигнализации, влияя на Frizzled рецепторы и LRP5-6 ко-рецептор и являются ингибиторами Wnt/beta-catenin клеточного регуляторного пути [5, 10].

Поскольку ген *DKK4* является ингибитором Wnt регуляторного клеточного пути, который участвует в регуляции пролиферации и опухолевом росте, то метилирование гена *DKK4* может приводить к ингибированию его функции, тем самым способствуя активации пролиферации и росту опухоли [8, 9, 11].

### ВЫВОДЫ

1. При количественной оценке содержания метилированной ДНК по CG-сайтам первого экзона гена *DKK4* было выявлено высокое содержание метилированной ДНК в образцах ткани аденокарциномы грудной железы ( $36,8 \pm 2,63\%$ ), которое было значительно выше, чем в неизменной ткани грудной железы, взятой от этих же больных ( $19,87 \pm 1,47\%$ ,  $p \leq 0,001$ ).
2. Чувствительность количественного определения уровня содержания метилированной ДНК гена *DKK4*, рассчитанная с помощью программы MedCalc, составляет  $86,9\%$ , а специфичность –  $91,3\%$ , что позволяет рекомендовать его как биомаркер для ранней диагностики аденокарциномы грудной железы.
3. Метод пиросеквенирования, предложенный для анализа метилирования первого экзона гена *DKK4*, является быстрым, надежным и высокоспецифичным методом, позволяющим количественно определять содержание метилированной ДНК в образцах ткани грудной железы.



**Рис. 3. Усредненный анализ сравнения содержания метилированной ДНК по CG-сайтам в первом экзоне гена DKK4 в образцах ткани аденокарциномы грудной железы (1) и нормальной ткани грудной железы (2)**

**Аналіз епігенетичної модифікації гена супресора пухлинного росту DKK4 методом кількісного піросеквенування при аденокарциномі грудної залози**

**В.М. Запорожан, В.В. Бубнов, В.Г. Марічереда, Ю.Ю. Петровський, Д.Ю. Андронов**

Метою даного дослідження було оцінювання значущості кількісного визначення гіперметилованості першого екзону гена DKK4 в якості біомаркера пухлинної трансформації епітеліальних клітин грудної залози хворих на аденокарциному 2–3-ї стадії. Аналіз метилованості було проведено методом кількісного піросеквенування з використанням набору PSQ96MA фірми Qiagen. Уміст метильованої ДНК у хворих на рак грудної залози в середньому становив  $36,8 \pm 12,63\%$ , тоді як у зразках умовно нормальної тканини грудної залози –  $19,37 \pm 7,1\%$ ,  $p \leq 0,01$ . Із 23 зразків тканини аденокарциноми грудної залози високий рівень вмісту метильованої ДНК першого екзону гена DKK4 було виявлено в 20 зразках ( $86,96\%$ ,  $p \leq 0,01$ ); в 3 зразках рівень метильованої ДНК був порівнянний з умістом у зразках умовно нормальної тканини. Отриманий результат дозволяє рекомендувати даний метод як біомаркер для ранньої діагностики аденокарциноми.

**Ключові слова:** метилованості ДНК, екзон гена DKK4, CG-сайт, аденокарцинома грудної залози.

**The analysis of tumor growth suppressor DKK4 gene epigenetic modification using method of quantitative pyrosequencing in conditions of breast adenocarcinoma**

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

The aim of the study was the evaluation of the quantitative determination of hypermethylation of DKK4 gene first exon as a biomarker of the breast epithelial cells malignant transformation in patients with adenocarcinoma (2–3 stage). The analysis of DNA methylation was performed by quantitative pyrosequencing using the set PSQ96MA (Qiagen, USA). The average methylated DNA level in conditions of breast cancer equals to  $36,8 \pm 12,63$  percents whereas the same normal breast indexes equal to  $19,37 \pm 7,1$  percents,  $p \leq 0,01$ . The increased content of methylated DNA in DKK4 gene first exon was revealed in 20 samples of breast adenocarcinoma tissues out of 23 ( $86,96\%$ ,  $p \leq 0,01$ ); in the rest 3 samples the investigated content of methylated DNA was the comparable with the same index in the normal breast tissues. The obtained result allows to recommend this method as a biomarker for early diagnostics of adenocarcinoma.

**Key words:** DNA methylation, DKK4 gene, CG-site, breast adenocarcinoma.

**Сведения об авторах**

**Запорожан Валерий Николаевич** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (048) 723-33-24

**Бубнов Владимир Вячеславович** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (067) 484-78-22

**Марічереда Валерія Геннадієвна** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (066) 794-42-42

**Петровський Юрій Юрьевич** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (067) 763-89-80

**Андронов Дмитрий Юрьевич** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (050) 495-74-75. E-mail: andronov\_d@bk.ru

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Muñoz A, Esteller M, González-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer // *Oncogene*. – 2006. – 25. – P. 4116–4121.
- Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, Papageorgio CN, Shi H, Caldwell CW. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2009. – 48. – P. 828–841.
- Gandhirajan RK, Staib PA, Minke K, Gehrke I, Plickert G, Schlösser A, Schmitt EK, Hallek M, Kreuzer KA. Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo // *Neoplasia*. – 2010. – 12. – P. 326–335.
- Kawano Y., Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway // *J. Cell Sci.* – 2003. – 116. – P. 2627–2634.
- Klopocki E., Kristiansen G., Wild P. J. et al. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors // *Int. J. Oncol.* – 2004. – 25. – P. 641–649.
- Moskalev EA, Zavgorodnij MG, Majorova SP, Vorobjev IA, Jandaghi P, Bure IV, Hoheisel JD. Correction of PCR-bias in quantitative DNA methylation studies by means of cubic polynomial regression // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – 39. – e77.
- Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators // *Oncogene*. – 2006. – 25. – P. 7469–7481.
- Nojima M., Suzuki H., Toyota M. et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer // *Oncogene*. – 2007. – 26. – P. 4699–4713.
- Polakis P. Wnt signaling and cancer // *Genes Dev.* – 2000. – 14. – P. 1837–1851.
- Stoehr R., Wissmann C., Suzuki H. et al. Deletions of chromosome 8p and loss of SFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer // *Lab. Invest.* – 2004. – 84. – P. 465–478.
- Suzuki H., Toyota M., Caraway H. et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer // *Br. J. Cancer*. – 2008. – 98. – P. 1147–1156.
- Suzuki H., Watkins D.N., Jair K.W. et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer // *Nat. Genet.* – 2004. – 36. – P. 417–422.
- Zhang L, Gao X, Wen J, Ning Y, Chen YG. Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation // *J Biol Chem*. – 2006. – 281. – P. 8607–8612.
- Yau TO, Chan CY, Chan KL, Lee MF, Wong CM, Fan ST, Ng IO. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/beta-catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing // *Oncogene*. – 2005. – 24. – P. 1607–1614.

Статья поступила в редакцию 16.07.2014