

**АНАЛИЗ АБЕРРАНТНО-МЕТИЛИРОВАННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В СОСТАВЕ
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО**

А.А. Пономарева^{1,3}, А.А. Бондарь², А.Ю. Добродеев¹

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева

¹Томский НИИ Онкологии,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, 630090

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: anastasia-ponomaryova@rambler.ru

**ANALYSIS OF ABERRANTLY METHYLATED SEQUENCES IN CIRCULATING DNA FROM
BLOOD OF PATIENTS WITH LUNG CANCER**

A.A. Ponomaryova^{1,3}, A.A. Bondar², A.Yu. Dobrodeev¹

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.V. Cherdyntseva

¹Tomsk Cancer Research Institute, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 8, 630090

³National Research Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenina str., 30, 634050

E-mail: anastasia-ponomaryova@rambler.ru

Abstract. Malignant cell transformation is accompanied by two processes of DNA methylation changes: promoter hypermethylation of specific genes and hypomethylation of retrotransposons. The composition of circulating DNA (cirDNA) from plasma and cell-surface-bound circulating DNA (csb-cirDNA) was shown earlier to be altered in the blood of cancer patients due to accumulation of tumor-specific aberrantly methylated DNA fragments, which are currently considered valuable cancer markers. The present study compares LINE-1 retrotransposon methylation patterns in plasma cirDNA and csb-cirDNA from untreated lung cancer patients (LC) and healthy donors. Concentrations of methylated LINE-1 region 1 copies (LINE-1met) were assayed by real-time methylation-specific PCR. In order to normalize the LINE-1 methylation level, the LINE-1 region 2 concentration was evaluated, which was independent of the methylation status (LINE-1Ind). We recorded an statistically significant increase of the LINE-1 methylation index determined as (LINE-1met/LINE-1Ind) due to the profound LINE-1Ind decrease (Mann-Whitney test, $p = 0.005$). Plasma cirDNA demonstrated no difference in the ratio LINE-1met/LINE-1Ind between LC patients and healthy donors ($p = 0.40$). The data obtained agree with our earlier results, which showed that csb-cirDNA was a highly informative material for lung cancer diagnostics.

Изменение профиля метилирования ДНК является одним из наиболее ранних и распространенных событий канцерогенеза. Имеются данные о гипометилировании LINE-1 в злокачественных опухолях легких [1, 2]. Основными компонентами aberrантного метилирования ДНК клеток опухоли являются

гиперметилирование промоторов некоторых генов и гипометилирование значительной части ДНК, в частности повторяющихся последовательностей ретротранспозонов. Показано, что при онкологических заболеваниях в составе циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухолеспецифичных aberrантно метилированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами [3]. Целью настоящего исследования явилось проведение сравнительного анализа уровня метилирования LINE-1 ретроэлементов в циркулирующих ДНК крови больных раком легкого и здоровых доноров. В исследование было включено 21 больной РЛ (T₁₋₃N₀₋₃M₀), с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 40-75 лет, находившихся на лечении в клинике НИИ онкологии. Материалом для исследования послужила венозная кровь, которая забиралась до лечения. Для выделения цирДНК из плазмы и фракций крови, и цирДНК после бисульфитной конверсии использовали наборы «Биосилика». Анализ уровня метилирования LINE-1 элементов с использованием количественной метил-специфичной ПЦР. Рассчитывали индекс метилирования как долю метилированных молекул от общего числа молекул по формуле (%) = 100 × (LINE-1met/LINE-1Ind). В скп-цирДНК при вычислении ИМ (LINE-1met/LINE-1Ind) мы наблюдали значимое увеличение в группе больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами (критерий Манна-Уитни, p = 0,005). Согласно данным ROC-анализа, оценка индекса метилирования LINE-1 повторов в цирДНК фракции, связанной с поверхностью клеток крови, позволяет с чувствительностью 78% и специфичностью 80% отличить больных РЛ от здоровых доноров (при пороговом значении ИМ 53%). В цирДНК плазмы ИМ (LINE-1met/LINE-1Ind) в общей группе больных не отличается от уровня здоровых доноров (p = 0,398). При анализе связи между ИМ (LINE-1met/LINE-1Ind) в цирДНК крови и гистологическим типом опухоли установлено, что в цирДНК плазмы больных с аденокарциномой ИМ значимо ниже, чем у больных с плоскоклеточным раком легкого (p = 0,021), и в скп-цирДНК для обоих гистотипов наблюдается одинаковое увеличение ИМ по сравнению с контролем.

Таблица 1

Индекс метилирования LINE-1 в цирДНК крови больных РЛ и здоровых доноров

Группа РЛ	n	Скп-цирДНК*	Критерий Манна-Уитни	цирДНК плазмы крови	Критерий Манна-Уитни
АК	8	67 [#] ±8	p = 0,832	17 [#] ±3	p = 0,021
ПКРЛ	13	70±13		32±5	
Больные РЛ (общая группа)	21	69±7	p = 0,005	21±4	p = 0,398
Здоровые доноры	23	37±6		27±5	

Примечание: * - индекс метилирования LINE-1 (%), представлены средние значения и стандартная ошибка; # - сравнение проводилось между группами ПКРЛ и АК; ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого, АК – аденокарцинома.

Наши данные о снижении концентрации LINE-1met фрагментов в цирДНК крови согласуются с результатами нескольких полногеномных исследований, согласно которым разные классы длинных диспергированных повторов в цирДНК плазмы представлены различным образом: длинные LINE-1 повторы недопредставлены, и наоборот, короткие Alu повторы перепредставлены в цирДНК плазмы/сыворотки крови по сравнению с геномной ДНК из клеток [4, 5]. Причем пониженное для LINE-1 или повышенное для Alu содержание фрагментов цирДНК становится значимо более выраженным в

цирДНК у больных с опухолями по сравнению со здоровыми донорами [4]. Кроме того, значимое снижение концентрации фрагментов LINE-1 района 2 в цирДНК крови у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами может быть связано с репрессией хроматина в зонах LINE-1 при ослаблении метилирования ДНК, что объясняется активацией защитных механизмов клетки [6].

Таким образом, выявленные в крови при РЛ более значительные изменения концентрации фрагмента LINE-1 района 2 во фракции цирДНК, связанной с поверхностью клеток, по сравнению с цирДНК плазмы, указывают на различия в механизмах накопления фрагментов ДНК в плазме и связанной с клетками фракции крови и подтверждают более ранние данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики рака, в том числе злокачественных новообразований легкого [7, 8]. Представляется интересным дальнейшее исследование относительной представленности и профиля метилирования разных районов LINE-1 элементов, которые наряду с другими aberrантно метилированными районами могут войти в состав новых панелей онкомаркеров крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saito K., Kawakami K., Matsumoto I., Oda M., Watanabe G., Minamoto T. (2010). Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, no. 16, pp. 2418-2426.
2. Suzuki M., Shiraishi K., Eguchi A., Ikeda K., Mori T., Yoshimoto K., Ohba Y., Yamada T., Ito T., Baba Y., Baba H. (2013). Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, no. 29, pp. 1308-1314.
3. Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G.A., Pantel K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Rev Clin Oncol*, no. 11, pp. 145-156.
4. Beck J., Urnovitz H.B., Mitchell W.M., Schütz E. (2010). Next generation sequencing of serum circulating nucleic reveals differences to healthy and nonmalignant controls acids from patients with invasive ductal breast cancer. *Mol. Cancer Res*, no. 8, pp. 335-342.
5. Morozkin E.S., Loseva E.M., Morozov I.V., Kurilshikov A.M., Bondar A.A., Rykova E.Y., Rubtsov N.B., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2012). A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing. *Expert Opin Biol Ther*, no. 12, pp. S141-S153.
6. Dunican D.S., Cruickshanks H.A., Suzuki M., Semple C.A., Davey T., Arceci R.J., Greally J., Adams I.R., Meehan R.R. (2013). Lsh regulates LTR retrotransposon repression independently of Dnmt3b function. *Genome Biol*, no. 14, pp. R146.
7. Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2012). Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther*, no. 12, pp. S141-S153.
8. Ponomaryova A., Rykova E., Cherdyntseva N., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Bryzgalov L.O., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2013). Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, no. 81, pp. 397-403.