

Epigenetic «probes» for lung cancer monitoring: LINE-1 methylation pattern in blood-circulating DNA

A.A. Ponomaryova^{1,3}, E.Y. Rykova², N.V. Cherdyntseva^{1,4}, A.A. Bondar², A.Y. Dobrodeev¹, A.A. Zavyalov¹, S.A. Tuzikov¹, L.O. Bryzgalov⁵, T.I. Merkulova⁵, V.V. Vlassov², P.P. Laktionov²

¹ Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ The National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

⁴ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁵ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

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 21 untreated lung cancer patients (LC) and 23 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). The LINE-1met concentration in csb-cirDNA tended to decrease (by a factor of 1.4) in blood from LC patients in comparison to healthy donors (Mann-Whitney test, $P=0.16$). The LINE-1Ind concentration in csb-cirDNA (methylation-independent) was found to be threefold lower in LC patients and fourfold lower in patients with adenocarcinoma than in healthy donors. That is why, along with the expected decrease in LINE-1met concentration in csb-cirDNA, we recorded an unexpected statistically significant increase of the LINE-1 methylation index determined as (LINE-1met/LINE-1Ind) due to the profound LINE-1Ind decrease. Plasma cirDNA demonstrated no difference in the LINE-1 methylation index (LINE-1met/LINE-1Ind) between LC patients and healthy donors (Mann-Whitney test, $P = 0.40$). The data obtained agree with our earlier results, which showed that csb-cirDNA was a highly informative material for lung cancer diagnostics.

Key words: blood-circulating DNA; aberrant methylation; LINE-1 retrotransposons; diagnostics; lung cancer.

Эпигенетические «зонды» для мониторинга рака легкого: профиль метилирования элементов LINE-1 в циркулирующей ДНК крови

А.А. Пономарева^{1,3}, Е.Ю. Рыкова², Н.В. Чердынцева^{1,4}, А.А. Бондарь², А.Ю. Добродеев¹, А.А. Завьялов¹, С.А. Тузиков¹, Л.О. Брызгалов⁵, Т.И. Меркулова⁵, В.В. Власов², П.П. Лактионов²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии», Томск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Основными компонентами aberrантного метилирования ДНК клеток опухоли являются гиперметилирование промоторов некоторых генов и гипометилирование значительной части ДНК, в частности повторяющихся последовательностей ретротранспозонов. В опухолевой ткани при раке легкого (РЛ) выявлено гипометилирование ретротранспозонов семейства LINE-1. Известно, 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. В настоящей работе проведен сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 ретротранспозонов в цирДНК плазмы и скп-цирДНК 21 больного РЛ до лечения и 23 здоровых доноров. Определяли концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE-1 methylated, LINE-1 met) методом количественной метил-специфичной ПЦР. Для нормирования данных по метилированию оценивали концентрацию всех фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1 Independent, LINE-1Ind). Выявлена тенденция снижения концентрации метилированных фрагментов LINE met (в 1,4 раза) во фракции цирДНК, связанной с клетками крови, у больных РЛ (критерий Манна-Уитни, $p = 0,16$). Оказалось, что в группе больных РЛ концентрация всех фрагментов LINE-1Ind, которая не зависит от статуса метили-

рования, в 3 раза ниже (при аденокарциноме – в 4 раза) относительно здоровых доноров. Поэтому в скп-цирДНК крови при РЛ вместе с ожидаемым снижением общей концентрации LINE-1met выявлено неожиданное увеличение их относительной концентрации (LINE-1met/LINE-1Ind) за счет значительного снижения общего количества LINE-1Ind. В цирДНК плазмы индекс метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) у больных РЛ не отличается от здоровых доноров (критерий Манна-Уитни $p = 0,40$). Полученные результаты подтверждают более ранние данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики рака легкого.

Ключевые слова: циркулирующие ДНК крови; aberrантное метилирование; LINE-1 ретротранспозоны; диагностика; рак легкого.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Bondar A.A., Dobrodeev A.Y., Zavyalov A.A., Tuzikov S.A., Bryzgalov L.O., Merkulova T.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Epigenetic «probes» for lung cancer monitoring: LINE-1 methylation pattern in blood-circulating DNA. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(1):144-150. DOI 10.18699/VJ15.018

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В., Бондарь А.А., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузииков С.А., Брызгалов Л.О., Меркулова Т.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Эпигенетические «зонды» для мониторинга рака легкого: профиль метилирования элементов LINE-1 в циркулирующей ДНК крови. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(1):144-150. DOI 10.18699/VJ15.018

Изменение профиля метилирования ДНК – одно из наиболее ранних и распространенных событий канцерогенеза. Основными компонентами aberrантного метилирования являются гиперметилирование промоторов генов опухолевой супрессии и гипометилирование значительной части ДНК, сопровождающееся активацией онкогенов, ретротранспозонов и геномной нестабильностью (Ehrlich, 2002; Bourc'his, Bestor, 2004). Показано во многих случаях, что изменение статуса метилирования предшествует генетическим мутациям и определяет развитие молекулярных событий при канцерогенезе (Esteller, 2008; Kristensen, Hansen, 2009). Достоверно известно, что при раке в составе циркулирующих ДНК (цирДНК) плазмы/сыворотки крови накапливаются фрагменты aberrантно метилированных ДНК, идентичных ДНК опухоли, которые могут быть потенциальными онкомаркерами (Radpour et al., 2011; Carethers, 2012; Schwarzenbach et al., 2014).

Анализ эпигенетического статуса фрагментов ДНК, циркулирующих в крови, является привлекательным для диагностики, однако его применение осложняется низкой концентрацией молекул ДНК, невысоким содержанием опухоли-специфических ДНК относительно ДНК здоровых клеток и небольшим размером фрагментов (Peters, Pretorius, 2011). Недавно была показана возможность увеличения эффективности определения метилированных фрагментов генов опухолевой супрессии за счет использования фракции циркулирующих ДНК, связанных с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), как эритроцитов, так и лейкоцитов (Ponomaryova et al., 2013). Было установлено, что фракция скп-цирДНК содержит ДНК больше, чем в плазме, представлена более длинными молекулами и эффективнее накапливает «опухолевые» фрагменты (Rykova et al., 2012; Ponomaryova et al., 2013). Кроме того, чувствительность анализа можно увеличить за счет выбора повторяющихся последова-

тельностей ДНК в качестве кандидатных онкомаркеров вместо стандартно используемых известных однокопийных генов опухолевой супрессии, которые инактивированы в опухолях путем гиперметилирования (Ramzy et al., 2011; Hoshimoto et al., 2012). Например, длинные диспергированные ядерные повторы (Long Interspersed Nuclear Elements) многократно представлены в геноме человека и составляют приблизительно 17 % его длины (до 500 000 копий/геном) (LINE-1, LINE-2, LINE-3 и HAL-1) (Lander et al., 2001). Среди них LINE-1 является самым крупным классом автономных ретроэлементов у млекопитающих. Имеются данные о гипометилировании LINE-1 в злокачественных опухолях легких (Saito et al., 2010; Suzuki et al., 2013).

В этой связи исследование уровня метилирования LINE-1 элементов в составе циркулирующих ДНК представляет значительный интерес.

Цели настоящей работы – проведение сравнительного анализа уровня метилирования LINE-1 элементов в цирДНК плазмы и скп-цирДНК крови больных раком легкого и здоровых доноров.

Материалы и методы

В исследование включены образцы крови 23 здоровых лиц, проживающих на территории Западно-Сибирского региона, и 21 больного немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), первично обратившихся в клинику Томского НИИ онкологии, в возрасте 48–65 лет (табл. 1). Диагноз морфологически верифицирован. Все исследования были проведены в соответствии с международными этическими правилами, получено разрешение этического комитета Томского НИИ онкологии.

Венозную кровь собирали в 0,05 М раствор ЭДТА в фосфатно-солевом буфере (соотношение крови и ЭДТА 1 : 5). Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови, фракцию цирДНК, связанных с клеточной по-

Tabl 1. Clinical and morphological features of NSCLC patients (n = 21)

Возраст, лет		Стадия	
≤ 60	10 (48 %)	I–II	0 (0 %)
> 60	11 (52 %)	III	21 (100 %)
Пол		Курение	
мужской	21 (100 %)	да	21 (100 %)
женский	0 (0 %)	нет	0 (0 %)
Гистологический тип			
плоскоклеточный рак легкого	13 (62 %)		
аденокарцинома	8 (38 %)		

верхностью (скп-цирДНК) получали последовательной обработкой клеток 5 мМ фосфатным буфером и 0,25 % раствором трипсина, как описано ранее (Ponomaryova et al., 2013). ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 3 мл ФБ-ЭДТА и 1 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd» (Новосибирск, Россия). ДНК из ФБ-ЭДТА и трипсиновой фракций объединяли, полученные суммарные препараты представляют собой скп-цирДНК. Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd» (Новосибирск, Россия).

Анализ уровня метилирования LINE-1 элементов проводили с использованием количественной метил-специфичной ПЦР. Определение концентрации метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE-1 methylated (LINE-1met) – последовательность 241–361, GenBank локус X58075) проводилось методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров 5'-gtgggatagattctgtggtgcgcgttt-3' (прямой), 5'-aaaaaaaataacgaacgcacctaataa-3' (обратный) и флюоресцентный зонд 5'-(5,6)-Tamra ttgaaaagcgtaatattcgggtgggagtgatt-3-BHQ2' (Aragicio et al., 2009). Для нормирования данных по метилированию оценивали концентрацию всех фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1 Independent (LINE-1Ind) – последовательность 162925–163131, GenBank локус AL162574.14) методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров 5'-ttttggaataggtgtggtg-3' (прямой), 5'-acttactacccacacaata-3' (обратный) и флюоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, Hayward, California, США), как описано ранее (Bryzgunova et al., 2013). Для того чтобы точно определить концентрацию фрагментов LINE-1 районов 1 и 2 в исследуемых образцах, в качестве стандарта для калибровки использовали препарат полностью метилированной бисульфитконвертированной ДНК человека с известной концентрацией (Zymo Research, США). Концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE-1met) и нормировочных фрагментов LINE-1 района 2 (LINE-1Ind) рассчитывали в геномах-эквивалентах (ГЭ) на 1 мл крови. Индекс метилирования рассчитывали как долю метили-

рованных молекул от общего числа молекул по формуле (%) = 100 × (LINE-1met/LINE-1Ind). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для каждой выборки вычисляли среднее значение и стандартную ошибку. Статистическую значимость различий определяли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Анализ чувствительности и специфичности тестов проводили методом построения ROC кривых в программе «MedCalc».

Результаты и обсуждение

В недавней работе Saito с соавт. (2010) для больных НМРЛ уже на стадии IA в ДНК ткани опухоли методом метил-специфичной количественной ПЦР было показано снижение уровня метилирования LINE-1 по сравнению с нормальной тканью. Гипометилирование LINE-1 при раке легкого было выявлено также другим методом: пиросеквенированием бисульфит-модифицированной ДНК, выделенной из опухоли (Suzuki et al., 2013). В настоящей работе мы использовали метод количественной метил-специфичной ПЦР для определения статуса метилирования LINE-1 при раке легкого в циркулирующей ДНК крови.

Полученные нами результаты показали, что есть тенденция к снижению количества копий метилированных фрагментов выбранного нами для анализа LINE-1 района 1 (LINE-1met) в связанной с клетками фракции цирДНК крови у больных НМРЛ, которая более выражена у пациентов с аденокарциномой (АК), чем у больных плоскоклеточным раком (ПКРЛ) (табл. 2). Однако снижение при АК также статистически незначимо по сравнению со здоровыми (12 724 ± 3 202 ГЭ/мл против 26 725 ± 2 781 ГЭ/мл, p = 0,251, критерий Манна-Уитни). В общей группе больных НМРЛ выявленная тенденция согласуется с данными, полученными на опухолевой ткани (Saito et al., 2010; Suzuki et al., 2013). Однако Suzuki с соавт. (2013) при сопоставлении пациентов с разными гистотипами НМРЛ показали более значительное снижение уровня метилирования LINE-1 элементов в ДНК опухолевой ткани у больных ПКРЛ по сравнению с АК. Различия в этих результатах могут быть связаны с анализом разных

Tabl 2. Concentration of LINE-1 region 1 methylated fragments (LINE met) in blood

Группа НМРЛ	n	Скп-цирДНК*	Критерий Манна-Уитни	цирДНК плазмы крови*	Критерий Манна-Уитни
Аденокарцинома	8	12724 [#] ± 3202	p = 0,167	1202 [#] ± 533	p = 0,949
Плоскоклеточный рак легкого	13	24013 ± 3636		1138 ± 5053	
Больные НМРЛ (общая группа)	21	19364 ± 1918	p = 0,376	1163 ± 459	p = 0,817
Здоровые доноры	23	26725 ± 2781		1012 ± 489	

Here and in table 3: p – significance value, * concentration is calculated as genomic equivalents (GE) per 1 ml of blood, mean values and standard errors are presented; # comparison between the SCC and AC groups. Abbreviations: SCC – squamous cell carcinoma, AC – adenocarcinoma, NSCLC – non-small-cell lung cancer.

Table 3. Concentration of LINE-1 region 2 fragments (LINE-1 Ind) in blood

Группа НМРЛ	n	Скп-цирДНК*	Критерий Манна-Уитни	цирДНК плазмы крови*	Критерий Манна-Уитни
Аденокарцинома	8	19495 [#] ± 4132	p = 0,143	7755 [#] ± 2351	p = 0,106
Плоскоклеточный рак легкого	13	33925 ± 3978		3245 ± 1352	
Больные НМРЛ (общая группа)	21	27317 ± 2156	p = 0,009	5048 ± 1310	p = 0,985
Здоровые доноры	23	76987 ± 6341		5010 ± 1108	

Designations follow table 2.

районов LINE-1, так же, как с различными источниками ДНК, в нашем случае мы анализируем цирДНК крови, в которой общий профиль метилирования фрагмента определяется комбинацией молекул из разных источников – опухоли и здоровых тканей.

Согласно общепринятой практике анализа статуса метилирования целевых последовательностей, мы определяли не только абсолютное количество, но также относительное содержание метилированных фрагментов LINE-1met в цирДНК. Для этого нормировали количество метилированных фрагментов на общее количество фрагментов LINE-1, циркулирующих в крови. Это количество определяли в бисульфит-модифицированной цирДНК методом ПЦР анализа района 2 (LINE Ind), который был выбран в связи с тем, что в области комплементарности праймеров отсутствуют CpG динуклеотиды, поэтому с помощью одной реакции амплификации можно определять суммарное количество фрагментов в этом районе LINE-1 независимо от статуса метилирования. Данные по концентрации LINE-1Ind представлены в табл. 3, из которой следует, что в скп-цирДНК эта концентрация достоверно снижается у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами. По данным ROC-анализа выбрано оптимальное пороговое значение концентрации фрагментов LINE-1Ind в скп-цирДНК для дискриминирования больных РЛ и здоровых доноров, которое составляет 19 000 ГЭ/мл крови. При этом значении концентрации LINE-1Ind в цирДНК фракции, связанной с поверхностью клеток крови, позволяют с чувствительностью 79 % и специфичностью 64 % отличить больных РЛ от здоровых доноров.

Оказалось, что при РЛ концентрация LINE-1Ind в среднем ниже в 3 раза (при аденокарциноме – в 4 раза), а LINE-1met – только в 1,4 раза в скп-цирДНК больных РЛ относительно здоровых доноров. Поэтому в скп-цирДНК при вычислении индекса метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) мы наблюдаем парадоксальный феномен: значимое увеличение в группе больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами (p = 0,005, критерий Манна-Уитни) (рисунок). 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 %).

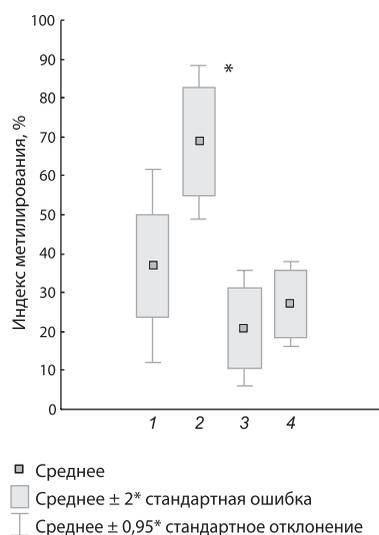
В цирДНК плазмы индекс метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) в общей группе больных не отличается от уровня здоровых доноров (p = 0,398, критерий Манна-Уитни), поскольку концентрация LINE-1Ind в плазме снижается только в группе больных ПКРЛ, и не так существенно, как в скп-цирДНК (табл. 4). При анализе связи между индексом метилирования (LINE-1met/LINE-1Ind) в цирДНК крови и гистологическим типом опухоли установлено, что в цирДНК плазмы больных с аденокарциномой индекс метилирования достоверно ниже, чем у больных с ПКРЛ (p = 0,021, критерий Манна-Уитни), и в скп-цирДНК для обоих гистотипов наблюдается одинаковое увеличение индекса метилирования по сравнению с контролем (табл. 4).

Таким образом, мы обнаружили в цирДНК крови больных РЛ ожидаемое, хотя и незначительное, снижение абсолютного количества метилированных фрагментов LINE-1 района 1 и неожиданное увеличение их относи-

Tabl 4. LINE-1 methylation index in cirDNA from blood of NSCLC patients and healthy subjects

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

* LINE-1 methylation index (%), mean values and standard errors are presented; # comparison between the SCC and AC groups. Abbreviations: SCC – squamous cell carcinoma, AC – adenocarcinoma, NSCLC – non-small-cell lung cancer.



LINE-1 methylation levels in cirDNA from blood of lung cancer patients and healthy subjects.

1 – healthy subjects, csb-cirDNA; 2 – NSCLC patients, csb-cirDNA; 3 – healthy subjects, cirDNA from plasma; 4 – NSCLC patients, cirDNA from plasma; * differences are statistically significant.

тельной концентрации за счет значительного снижения общего количества LINE-1 фрагментов района 2. Ранее было показано, что значимые различия в уровне метилирования фрагментов геномной ДНК, выделенной из ткани, могут не воспроизводиться при анализе цирДНК плазмы (Ponomaryova et al., 2013; Schwarzenbach et al., 2014). Это явление может быть связано с неравномерным фрагментированием молекул ДНК за пределами клеток и в кровотоке, и как следствие, с неоднородной представленностью цирДНК в крови (Skvortsova et al., 2011). Наши данные о сни-

жении концентрации LINE-1 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 (Anker et al., 2001; Beck et al., 2009, 2010; Van der Vaart et al., 2009; Morozkin et al., 2012). Причем пониженное для LINE-1 или повышенное для Alu содержание фрагментов цирДНК становится достоверно более выраженным в цирДНК у больных с опухолями по сравнению со здоровыми донорами (Anker et al., 2001; Beck et al., 2010). Кроме того, значимое снижение концентрации фрагментов LINE-1 фрагментов района 2 в цирДНК крови у больных НМРЛ 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 (Dunican et al., 2013).

Нами впервые получены данные об уровне метилирования LINE-1 повторов в цирДНК крови у больных раком легкого. Недавно метилирование LINE-1 было проанализировано в сыворотке крови больных раком печени и больных меланомой (Ramzy et al., 2011; Hoshimoto et al., 2012). Важным итогом нашего исследования является тот факт, что трансляция данных, полученных путем анализа ДНК ткани опухоли, на цирДНК крови не всегда приводит к ожидаемым результатам. Поэтому в дальнейшем для определения панели актуальных эпигенетических маркеров, пригодных для диагностики рака по анализу крови, представляется наиболее перспективным исследование профиля метилирования молекул, непосредственно формирующих пул циркулирующей ДНК. Другой важный результат настоящей работы – это выявленные нами в крови больных НМРЛ более значительные изменения концентрации фрагмента LINE-1 района 2 в цирДНК, связанной с поверхностью клеток, чем в цирДНК плазмы, что говорит о разных механизмах накопления фрагментов ДНК в плазме и связанной с клетками фракции крови. Эти результаты подтверждают наши более ранние данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики рака, в том числе злокачественных новообразований легкого (Rykova et al., 2012; Ponomaryova et al., 2013). 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.

Acknowledgments

This work was supported by the Presidium of the Siberian Branch of the RAS and outside organization No. 65 (2012–2014); Program of Basic Research of the Presidium of the RAS “Fundamental Studies for the Development of biomedical technologies”, 2014; budgeted project VI.58.1.12; and the program “Postdoc at the Tomsk Polytechnic University”.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin. Chim. Acta.* 2001;313:143-146.
- Aparicio A., North B., Barske L., Wang X., Bollati V., Weisenberger D., Yoo C., Tannir N., Horne E., Groshen S., Jones P., Yang A., Issa J.P. LINE-1 methylation in plasma DNA as a biomarker of activity of DNA methylation inhibitors in patients with solid tumors. *Epigenetics.* 2009;4:176-184.
- Beck J., Urnovitz H.B., Mitchell W.M., Schütz E. 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.* 2010;8(3):335-342. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0314
- Beck J., Urnovitz H.B., Riggert J., Clerici M., Schütz E. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin. Chem.* 2009;55(4):730-738. DOI: 10.1373/clinchem.2008.113597
- Bourc'his D., Bestor T.H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature.* 2004;431(7004):96-99.
- Bryzgunova O., Laktionov P., Skvortsova T., Bondar A., Morozkin E., Lebedeva A., Krause H., Miller K., Vlassov V. Efficacy of bisulfite modification and recovery of human of genomic and circulating DNA using commercial kits. *Eur. J. Mol. Biol.* 2013;1(1):1-8. DOI: 10.11648/j.ejmb.20130101.11
- Carothers J.M. Proteomics, genomics, and molecular biology in the personalized treatment of colorectal cancer. *J. Gastrointest Surg.* 2012;16(9):1648-1650. DOI:10.1007/s11605-012-1942-2
- Dunican D.S., Cruickshanks H.A., Suzuki M., Semple C.A., Davey T., Arceci R.J., Grealley J., Adams I.R., Meehan R.R. Lsh regulates LTR retrotransposon repression independently of Dnmt3b function. *Genome Biol.* 2013;14(12):R146. DOI:10.1186/gb-2013-14-12-r146
- Ehrlich M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J. Nutr.* 2002;132. Suppl. 8:2424S-2429S.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(11):1148-1159.
- Hoshimoto S., Kuo C.T., Chong K.K., Takeshima T.L., Takei Y., Li M.W., Huang S.K., Sim M.S., Morton D.L., Hoon D.S. AIM1 and LINE-1 epigenetic aberrations in tumor and serum relate to melanoma progression and disease outcome. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132(6):1689-1697. DOI: 10.1038/jid.2012.36
- Kristensen L.S., Hansen L.L. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin. Chem.* 2009;55(8):1471-1483. DOI: 10.1373/clinchem.2008.121962
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaanty K.D., Miner T.L., Delehaanty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen P., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissbach J., Heilig R., Saurin V., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Böcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglu S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korff I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y.J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
- 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. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012;12(1):S141-S153. DOI: 10.1517/14712598.2012.670631
- Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—a new paradigm in genetic behaviour. *Clin. Chim. Acta.* 2011;412(11/12):806-811. DOI: 10.1016/j.cca.2011.01.026
- 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. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2013;81(3):397-403. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.05.016
- Radpour R., Berekati Z., Kohler C., Lv Q., Bürki N., Diesch C., Bitzer J., Zheng H., Schmid S., Zhong X.Y. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS ONE.* 2011;6(1):e16080. DOI:10.1371/journal.pone.0016080
- Ramzy I.I., Omran D.A., Hamad O., Shaker O., Abboud A. Evaluation of serum LINE-1 hypomethylation as a prognostic marker for

- hepatocellular carcinoma. Arab J. Gastroenterol. 2011;12(3):139-142. DOI:10.1016/j.ajg.2011.07.002
- Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdynseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. Expert Opin. Biol. Ther. 2012;12. Suppl. 1:S141-S153. DOI:10.1517/14712598.2012.673577
- Saito K., Kawakami K., Matsumoto I., Oda M., Watanabe G., Minamoto T. Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 2010;16(8):2418-2426. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-2819
- Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G.A., Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. Nature Rev. Clin. Oncol. 2014;11(3):145-156. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.5
- Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Lebedeva A.O., Mak V.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylated cell-free DNA *in vitro* and *in vivo*. Circulating nucleic acids in plasma and serum (Ed. P.B. Gahan). United Kingdom: Springer, 2011:85-194. DOI: 10.1007/978-90-481-9382-0_25
- Suzuki M., Shiraishi K., Eguchi A., Ikeda K., Mori T., Yoshimoto K., Ohba Y., Yamada T., Ito T., Baba Y., Baba H. Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. Oncol. Rep. 2013;29(4):1308-1314. DOI: 10.3892/or.2013.2266
- Van der Vaart M., Semenov D.V., Kuligina E.V., Richter V.A., Pretorius P.J. Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform. Clin. Chim. Acta. 2009;409(1/2): 21-27. DOI: 10.1016/j.cca.2009.08.011

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090. Отв. секретарь редакции: С.В. Зубова, тел. (383)3634977*5415. Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г. При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна. Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Зав. отделом: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич. Компьютерная графика и верстка: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина. Подписано в печать 20.03.2015 г. Формат бумаги 60 × 84¹/₈. Усл.-печ. л. 17,78. Тираж 150 экз. Заказ № 91.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.