

Аномальное деметилирование и эктопическая экспрессия генов лейкотриеновых рецепторов *LTB4R/LTB4R2* при раке молочной железы

Калинкин А.И.¹, Сигин В.О.¹, Немцова М.В.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Кекеева Т.В.¹, Виноградов И.Ю.³, Виноградов М.И.⁴, Виноградов И.И.^{3,4}, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.¹, Танас А.С.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 — ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)»
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

3 — ГБУ Рязанской области «Областной клинический онкологический диспансер»
390046, г. Рязань, ул. Спортивная, д. 13

4 — ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, д. 9

Введение. Выявление и всесторонняя характеристика новых молекулярных маркеров злокачественных опухолей остаётся актуальной задачей онкологии. Ранее по результатам проведенного авторами широкогеномного скрининга дифференциального метилирования ДНК нормальных и опухолевых тканей молочной железы (МЖ) было выявлено аномальное деметилирование CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2* в опухолях относительно нормы.

Цель. Настоящее исследование посвящено молекулярной и клинической характеристике аномального деметилирования этого CpG-островка и экспрессии генов *LTB4R/LTB4R2* при раке молочной железы (PMЖ).

Методы. Для разведочного анализа использовали полученные авторами ранее результаты широкогеномного бисульфитного секвенирования Xmal-RRBS 110 образцов PMЖ и 6 образцов нормальной МЖ. В этой выборке был проведен сравнительный анализ уровней метилирования CpG-динуклеотидов в нормальной и опухолевой ткани 10 образцов трижды негативного (ТН) PMЖ с аномальным деметилированием *LTB4R/LTB4R2* и 6 образцов нормальной МЖ с использованием критерия Манна-Уитни. Для подтверждения аномального деметилирования в образцах ТН PMЖ было использовано бисульфитное секвенирование по Сэнгеру. Для изучения корреляции между уровнями метилирования и экспрессии и для оценки прогностической значимости экспрессии генов *LTB4R/LTB4R2* использовали данные 3 уровня по измерению метилирования с чипов Illumina HumanMethylation 450K, экспрессии RNA-seq, а также клинические характеристики 731 образцов из проекта TCGA-BRCA. Отличия между кривыми Каплана-Мейера сравнивали с использованием логранкового критерия.

Результаты. Определено, что аномальное деметилирование CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2* характерно для эпигеномного подтипа умеренно метилированных образцов ТН PMЖ. Определены дифференциально метилированные CpG-динуклеотиды CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2*; их дифференциальное метилирование подтверждено бисульфитным секвенированием по Сэнгеру. Установлена отрицательная корреляция между уровнем их метилирования и экспрессией генов *LTB4R* и *LTB4R2*. Показано, что общая выживаемость достоверно снижена в группе ТН PMЖ с высокой экспрессией *LTB4R*, а также в группе нормально-подобных опухолей МЖ с низкой экспрессией *LTB4R* и в группе LumВ опухолей МЖ с низкой экспрессией *LTB4R2*. Различия показателей выживаемости позволяют рассматривать уровни экспрессии *LTB4R/LTB4R2* как прогностический маркер при PMЖ, однако следует учитывать, что прогноз зависит от молекулярного подтипа опухоли. Это относится также к использованию уровней экспрессии *LTB4R/LTB4R2* в качестве потенциального предиктивного маркера чувствительности таких опухолей к ингибиторам лейкотриеновых рецепторов при проведении клинических испытаний.

Ключевые слова: рак молочной железы, широкогеномный анализ метилирования ДНК, лейкотриеновые рецепторы.

Для цитирования: Калинкин А.И., Сигин В.О., Немцова М.В., Кузнецова Е.Б., Кекеева Т.В., Виноградов И.Ю., Виноградов М.И., Виноградов И.И., Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Танас А.С. Аномальное деметилирование и эктопическая экспрессия генов лейкотриеновых рецепторов *LTB4R/LTB4R2* при раке молочной железы. *Медицинская генетика* 2021; 20(8): 21-30.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.08.21-30

Автор для корреспонденции: Калинкин Алексей Игоревич, e-mail: akalinkin@epigenetic.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.07.2021.

Abnormal demethylation and ectopic expression of leukotriene receptors genes *LTB4R/LTB4R2* in breast cancer

Kalinkin A.I.¹, Sign V.O.¹, Nemtsova M.V.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Kekeeva T.V.¹, Vinogradov I.Y.³, Vinogradov M.I.⁴, Vinogradov I.I.^{3,4}, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.¹, Tanas A.S.¹

1 — Research Centre for Medical Genetic
1 Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 — I. M. Sechenov First Moscow State Medical University
8 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

3 — Ryazan Regional Clinical Oncology Dispensary
13 Sportivnaya st., Ryazan, 390011, Russian Federation

4 — Ryazan State Medical University
9 Vysokovolt'naya st., Ryazan, 390026, Russian Federation

Background. The identification and comprehensive characterization of new molecular markers of malignant tumors remains an urgent task of oncology. Earlier, according to the results of a genome-wide screening of differential DNA methylation of normal and tumor breast tissues, abnormal demethylation of the CpG island of *LTB4R/LTB4R2* genes in tumors relative to norm was revealed.

Aim. The present study focuses on the molecular and clinical characterization of abnormal demethylation of this CpG island and expression of the *LTB4R/LTB4R2* genes in breast cancer (BC).

Methods. For exploratory analysis, we used the previously obtained results of genome wide bisulfite sequencing of breast cancer (BC) and normal mammary gland samples. From this set, 10 samples of triple-negative (TN) breast cancer with abnormal *LTB4R/LTB4R2* demethylation and 6 normal breast samples were selected, for which a comparative analysis of CpG methylation levels in cancer vs norm using the Mann-Whitney test was performed. Sanger bisulfite sequencing was used to confirm abnormal demethylation in TN BC samples. The analysis of the obtained electrophoregrams was carried out using the SeqBase software developed by the authors. To validate and assess the level of predictive significance of *LTB4R/LTB4R2* gene expression, level 3 data were used to measure methylation from Illumina HumanMethylation 450K arrays, RNA-seq expression, as well as clinical characteristics for 731 samples from the TCGA-BRCA project. Kaplan-Meier curves were compared using a logrank test.

Results. Abnormal demethylation of *LTB4R/LTB4R2* genes in breast tumors was confirmed by Sanger sequencing. Among samples from the TCGA-BRCA project, a group of TN BC samples with low methylation of *LTB4R/LTB4R2* genes was identified. Overall survival was significantly reduced in the TN breast cancer group with high *LTB4R* expression, as well as in the group of normal-like breast tumors with low *LTB4R* expression, and in the LumB group overall survival was significantly reduced when tumors demonstrated low *LTB4R2* expression.

Conclusions. Fine mapping of abnormal demethylation in individual CpG dinucleotides of the *LTB4R/LTB4R2* genes will make it possible to design an effective PCR system that may potentially be used to define patients with TN breast cancer that would benefit from leukotriene receptor therapeutic inhibition. Different expression levels of *LTB4R/LTB4R2* allow their use as a prognostic marker for breast cancer, but the prognosis directly depends on the molecular subtype of a tumor. This also applies to the use of different levels of *LTB4R/LTB4R2* expression as a predictive marker of the sensitivity of such tumors to leukotriene receptor inhibitors in case they enter clinical trials.

Keywords. Breast cancer, genome wide analysis of DNA methylation, leukotriene receptors

For citation: Kalinkin A.I., Sign V.O., Nemtsova M.V., Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Vinogradov I.Y., Vinogradov M.I., Vinogradov I.I., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V., Tanas A.S. Abnormal demethylation and ectopic expression of leukotriene receptors genes *LTB4R/LTB4R2* in breast cancer. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(8): 21-30. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.08.21-30

Corresponding author. Alexey I. Kalinkin; **e-mail:** akalinkin@epigenetic.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 30.07.2021.

Введение

Рак молочной железы (PMЖ) является одним из самых часто диагностируемых онкологических заболеваний среди женского населения. Согласно данным GLOBOCAN [1] за 2018 год зафиксировано около 2 млн новых случаев заболевания PMЖ, а

смертность от PMЖ составила 627 000 человек в год. PMЖ является высоко гетерогенным заболеванием с различными клиническими и молекулярными характеристиками [2]. Использование экспрессионного классификатора PAM50 или иммуногистохимиче-

ского анализа (ИГХ) позволяет определить молекулярный подтип РМЖ: люминальный А (LumA), люминальный В (LumB), HER2-экспрессирующий и трижды негативный (ТН) [2]. ТН подтип РМЖ является самым неблагоприятным из-за высокого метастатического потенциала, агрессивности клинического течения и незначительного количества молекулярных мишеней терапии [3]. Самой частой причиной гибели больных РМЖ являются отдаленные метастазы. К факторам повышения риска отдаленного метастазирования относят молекулярный подтип, возраст и количество пораженных метастазами лимфатических узлов [4].

Метод XmaI-RRBS, разработанный в нашей лаборатории, позволяет достоверно количественно измерить уровень метилирования индивидуальных CpG-динуклеотидов на протяжении изучаемых участков генов [5]. По результатам масштабного широкогеномного бисульфитного секвенирования методом XmaI-RRBS 116 образцов РМЖ, проведенного в нашей лаборатории, был выделен суперкластер умеренно метилированных образцов РМЖ различных ИГХ подтипов, в котором группа образцов ТН РМЖ отличается от других неметилированным состоянием CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2*, что может приводить к эктопической экспрессии данных генов [6]. Рассматриваемые гены кодируют лейкотриеновые рецепторы, которые являются представителями группы эйкозаноидов. Эйкозаноиды представляют собой биологически активные провоспалительные медиаторы. Сигналинг лейкотриеновых рецепторов ассоциирован с прогрессированием различных видов опухолей [7]. Согласно литературным источникам, после соединения лиганда LTB4 с рецепторами LTB4R/LTB4R2 запускаются каскады реакций, ведущие к пролиферации, метастазированию и адгезии опухолевых клеток ТН РМЖ к моноцитам [8–11].

Атлас раковых геномов (The Cancer Genome Atlas, TCGA) – проект, который был создан при поддержке Национального института здоровья (The National Institute of Health, NIH) и направлен на всестороннее исследование различных видов опухолей. Получаемые данные находятся в открытом доступе и ученые всего мира могут использовать их в своих исследованиях [12]. TCGA позволяет анализировать большие объемы данных для поиска новых прогностических и предиктивных маркеров, а также новых маркеров метилирования ДНК. К сожалению, ограничением TCGA в области анализа метилирования является использование гибридной платформы Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip, информативность которой значительно уступает методам широкогеномного би-

сульфитного секвенирования, в том числе XmaI-RRBS, используемому в нашей лаборатории [13].

Цель: настоящее исследование посвящено молекулярной и клинической характеристике аномально-геметилирования CpG-островка и экспрессии генов *LTB4R/LTB4R2* при РМЖ.

Задачи:

1) на собственных результатах широкогеномного скрининга дифференциального метилирования XmaI-RRBS определить эпигеномный подтип РМЖ, для которого характерно аномально-геметилирование CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2*, и отобрать образцы для детальной характеристики дифференциального метилирования этого CpG-островка;

2) по результатам XmaI-RRBS и бисульфитного секвенирования по Сэнгеру определить дифференциально метилированные CpG-динуклеотиды CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2*;

3) по данным проекта TCGA-BRCA исследовать корреляции между уровнем метилирования этих CpG-динуклеотидов и экспрессией генов *LTB4R* и *LTB4R2*;

4) по данным проекта TCGA-BRCA оценить прогностическую значимость экспрессии генов *LTB4R* и *LTB4R2* у пациенток с различными молекулярными подтипами РМЖ.

Методы

Данные широкогеномного анализа метилирования ДНК XmaI-RRBS

Для разведочного анализа использовали полученные авторами ранее результаты XmaI-RRBS 110 образцов РМЖ и 6 образцов нормальной МЖ [6]. Данные депонированы в базе NCBI GEO под идентификатором GSE122799.

Клинический материал

Бисульфитное секвенирование по Сэнгеру проводили на 10 образцах ТН РМЖ и 6 образцах нормальной МЖ. Клинический материал предоставлен Областным клиническим онкологическим диспансером (Рязань) и МНИОИ им. П.А. Герцена (Москва).

Данные проекта TCGA-BRCA

Данные о количественной экспрессии RNA-seq с платформы Illumina HiSeq и значения метилирования ДНК с чипов Illumina HumanMethylation450K (HM450K), а также клиническая информация об образцах были получены с портала TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) для 1083 образцов опухолевой ткани различных молекулярных подтипов РМЖ. Анализ дожития для оценки прогностического потенциала вы-

сокого и низкого уровня экспрессии *LTB4R/LTB4R2* проводился для 1083 пациенток с различными молекулярными подтипами, которые отбирались согласно экспрессионному классификатору PAM50.

Подготовка образцов и бисульфитное секвенирование по Сэнгеру

ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом после обработки фрагментов ткани протеиназой К. Праймеры для бисульфитной ПЦР и последующего секвенирования были разработаны с помощью программного обеспечения MethPrimer [14]. Олигонуклеотиды были синтезированы компанией Синтол (Москва, Россия). Обработку ДНК бисульфитом и последующую ПЦР проводили согласно ранее описанным протоколам [15, 16]. Последовательности праймеров и условия бисульфитной ПЦР: *LTB4RbisF*: 5'-ggtttggttttttagtttag-3', *LTB4RbisR*: 5'-aacaaattataaaatctactatcaaaaatc-3' (размер ПЦР-продукта 277 п.н.); реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 0,1–0,2 мкг геномной ДНК, 2,5 мкл ПЦР буфера (10x: 670 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 166 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween-20), 180 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 2,0 mM MgCl₂, 5 пМ каждого праймера, 1 ед. акт. термофильной ДНК-полимеразы, до конечного объема доводили деионизированной водой. Смесь под слоем минерального масла прогревали при 95°C в течение 5 минут и проводили 33 цикла ПЦР с параметрами: 95°C 40 с, 54°C 40 с и 72°C 40 с. Финальную элонгацию проводили 10 минут при 72°C. Чтобы минимизировать контаминацию неспецифическими ампликонами при секвенировании по Сэнгеру, продукты отбирали селекцией по длине при помощи системы E-Gel™ SizeSelect™ II Agarose Gels, 2% (Invitrogen, США). Бисульфитное секвенирование по Сэнгеру проводили по протоколам, описанным ранее [15, 16]. Меченые пробы очищались гликогеном (Roche, Швейцария) и 96%-ным этанолом. Образцы растворяли в Hi-Di формамиде и секвенировали на приборе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Анализ электрофореграмм проводился с помощью собственного программного обеспечения SeqBase (<http://www.epigenetic.ru/projects/seqbase>).

Статистический анализ

Для сравнения уровней метилирования CpG-динуклеотидов в нормальной и опухолевой ткани использовали критерий Манна-Уитни. Коэффициент корреляции Спирмена использовали для исследования взаимосвязи между экспрессией и метилированием. Разделение уровней экспрессии *LTB4R/LTB4R2* на

высокий и низкий выполняли с помощью метода максимально выбранной ранговой статистики (maximally selected rank statistics). Кривые Каплана-Мейера использовали для изучения общей выживаемости в разных группах экспрессии. Для сравнения кривых дожития использовали стандартный логранговый критерий. Все вычисления и построение графиков проводили с помощью языка статистического программирования R пакетами GGPlot2, STATS, SURVMINER, MAXSTAT.

Результаты и обсуждение

Ранее на основе анализа данных широкогеномного бисульфитного секвенирования Xmal-RRBS образцов РМЖ методом иерархической кластеризации мы выделили два суперкластера образцов: умеренно метилированных и гиперметилированных в CpG-островках [6]. Кластер умеренно метилированных образцов распадается на 4 подкластера, из них подкластер с метилолом modTNBC (умеренно метилированный ТН РМЖ) отличается от других подкластеров низкими значениями метилирования CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2* (рис. 1).

Исследуемая группа состояла из 10 образцов ТН подтипа РМЖ кластера modTNBC (умеренно метилированный ТН РМЖ; обведены красным пунктиром на рис. 1) и 6 образцов нормальной МЖ. Сравнительный анализ уровня метилирования CpG-пар между группами modTNBC и NORM (нормальная ткань МЖ) на различных расстояниях от сайта старта транскрипции с помощью критерия Манна–Уитни показал статистически значимое аномальное деметилирование в тканях ТН РМЖ ($p < 0,05$) в позиции +149 от сайта старта транскрипции *LTB4R* (рис. 2).

Для подтверждения аномального деметилирования в CpG-островке генов *LTB4R/LTB4R2* в тканях ТН РМЖ было проведено бисульфитное секвенирование ДНК по Сэнгеру опухолевой и нормальной ткани. На рис. 3 представлена схема исследуемого района (рис. 3А), приближенный участок с указанными позициями сайтов узнавания эндонуклеазы рестрикции XmaI и CpG-динуклеотидов, доступных для исследования методами XmaI-RRBS и HM450K (рис. 3Б), а также электрофореграммы исследования нормальной и опухолевой ткани (рис. 3В). Учитывая, что точность количественных оценок методом секвенирования по Сэнгеру не превышает 25%, по результатам бисульфитного секвенирования уровни метилирования цитозина в составе CpG-динуклеотидов оценивали визуально: снижение интенсивности пиков цитозина относительно тимина в том же положении рассматри-

вали как подтверждение аномального деметилирования. Показано снижение интенсивности сигналов пиков цитозина в опухолевой ткани исследуемой группы по сравнению с нормальной тканью МЖ.

Анализ уровня экспрессии (RNA-seq) и уровня метилирования (HM450K) по данным TCGA-BRCA (731 образец) показал статистически значимые ($p < 0,05$) отрицательные коэффициенты корреляции меж-

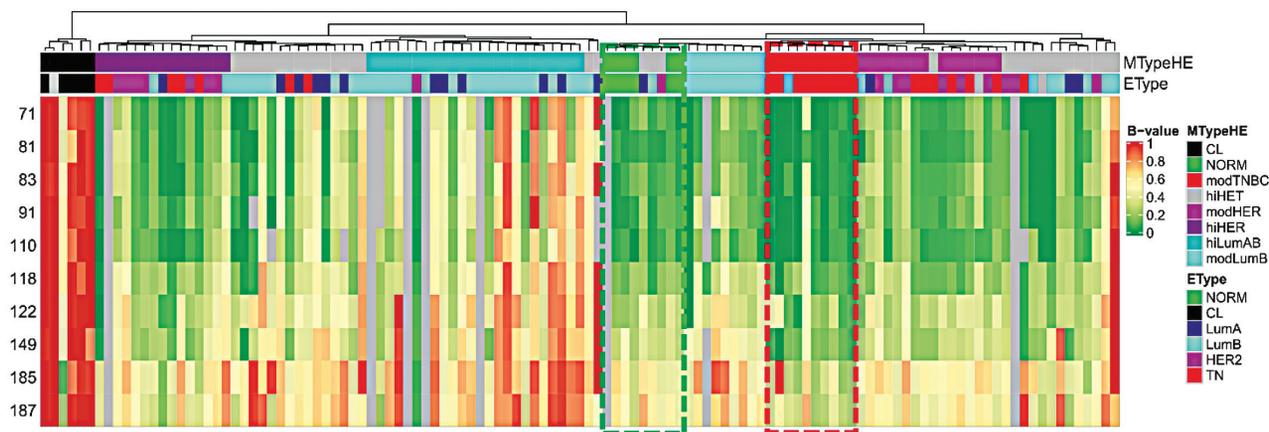


Рис. 1. Тепловая карта уровней метилирования, построенная по набору данных CpG-динуклеотидов CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2*. Строки соответствуют расстоянию от TSS (transcription start site; сайт старта транскрипции) гена *LTB4R*, а столбцы соответствуют образцам. Красный цвет соответствует высокометилированному состоянию CpG, желтый – полуметилированному и зеленый – низкому метилированию. В суперкластере с умеренным метилированием выделяется кластер с трижды-негативными образцами (modTNBC, обведено красным пунктиром). Зеленым пунктиром обведен кластер образцов нормальной МЖ. MTypeHE – метилотипы тканей и клеток молочной железы, определенные в исследовании [6], CL – клеточные линии РМЖ, NORM – образцы нормальной ткани МЖ, modTNBC – умеренно метилированные образцы TN РМЖ, hiHET – высокометилированные иммуногистохимически гетерогенные подтипы, modHER – умеренно метилированный HER2+ подтип, hiHER – высокометилированный HER2+ подтип, hiLumAB – высокометилированные образцы LumA и LumB подтипов, modLumB – умеренно метилированный LumB подтип, EType – иммуногистохимический молекулярный подтип РМЖ.

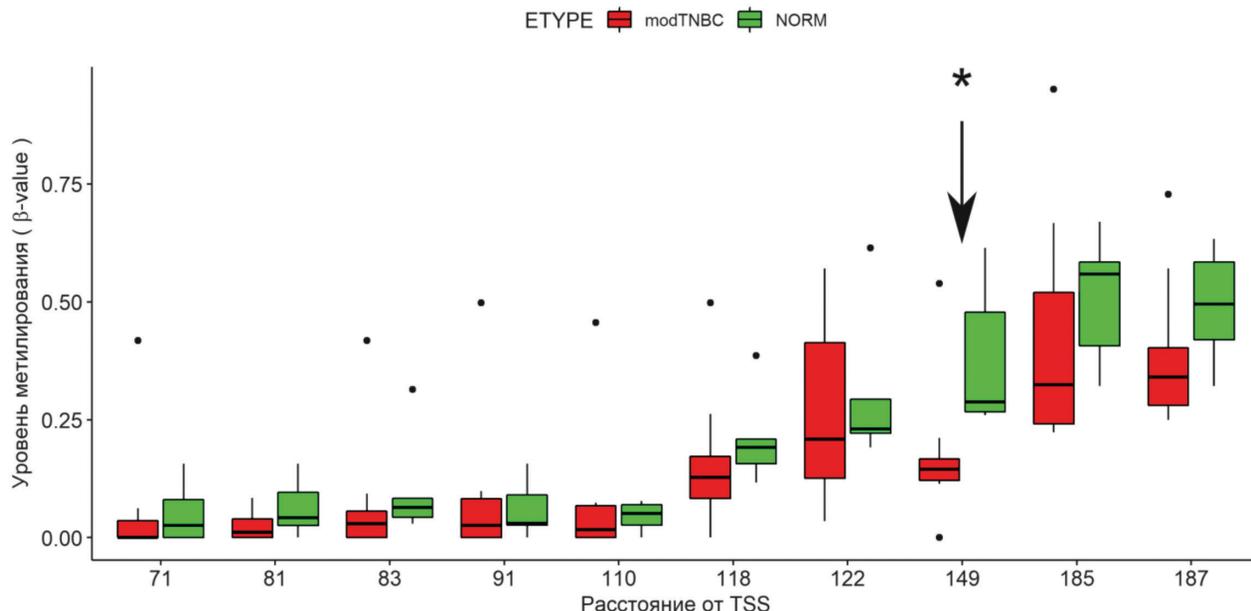


Рис. 2. Уровень метилирования (по результатам XmaI-RRBS) CpG-пар с 71 по 187 от сайта старта транскрипции гена *LTB4R* в CpG-островке генов *LTB4R/LTB4R2* для образцов умеренно метилированного TN РМЖ (modTNBC) и нормальной ткани МЖ (NORM). *-статистически значимое отличие по критерию Манна-Уитни.

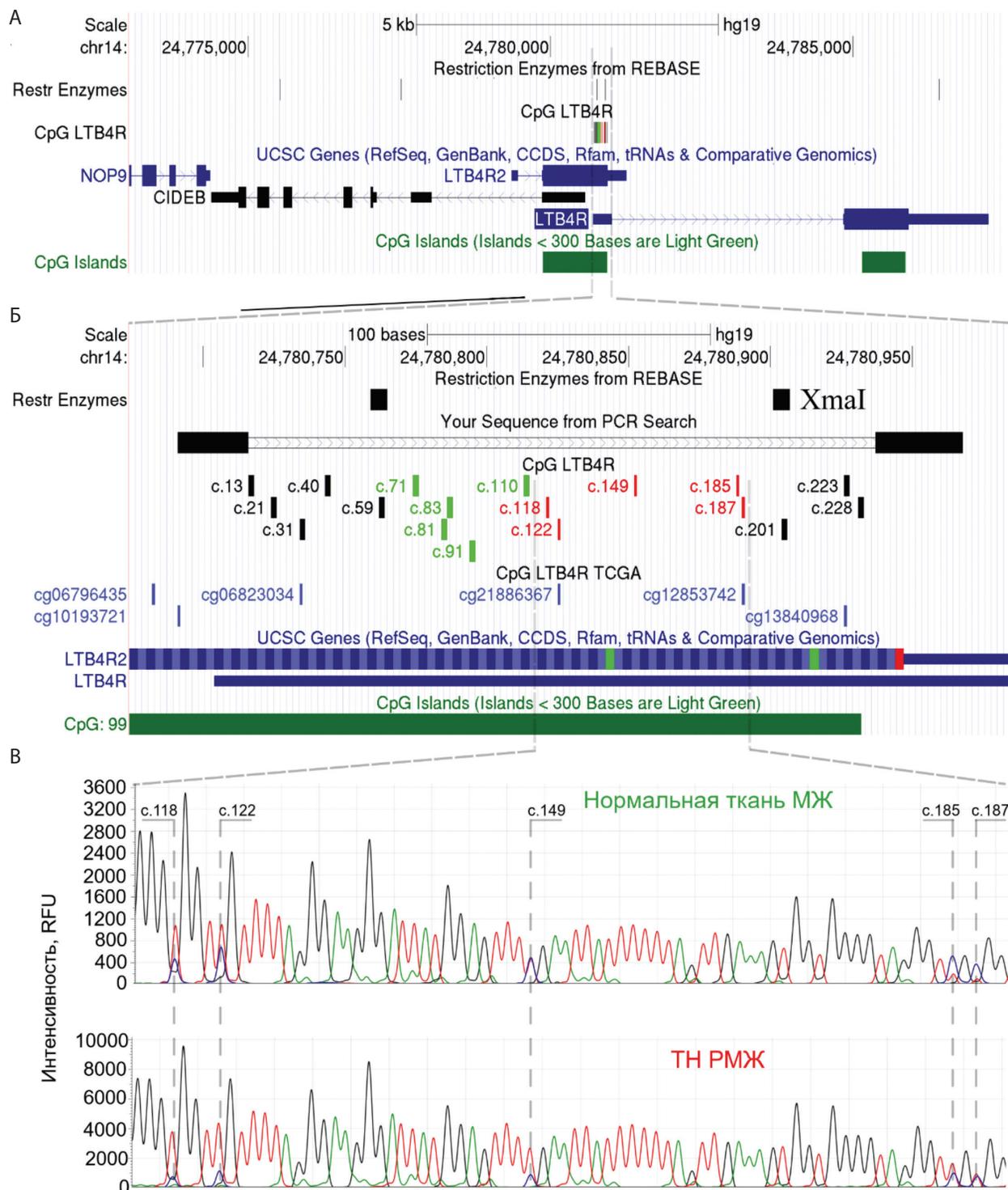


Рис. 3. Схема исследуемого региона и результаты бисульфитного секвенирования по Сэнгеру. А - Гены *LTB4R* и *LTB4R2* и ближайшие соседи. Б - CpG - динуклеотиды, статус метилирования которых проанализирован нами методом *XmaI*-RRBS ранее и бисульфитным секвенированием по Сэнгеру в настоящем исследовании. Красным цветом показаны CpG-пары, в которых предполагается наличие аномального деметилирования (трек «CpG LTB4R»). CpG-динуклеотиды, доступные для анализа чипами HM450K, показаны синим в треке «CpG LTB4R TCGA». В - по результатам бисульфитного секвенирования по Сэнгеру интенсивность сигнала цитозина относительно тимина в опухолевой ткани МЖ ниже в сравнении с нормальной тканью МЖ по всем исследованным CpG-динуклеотидам.

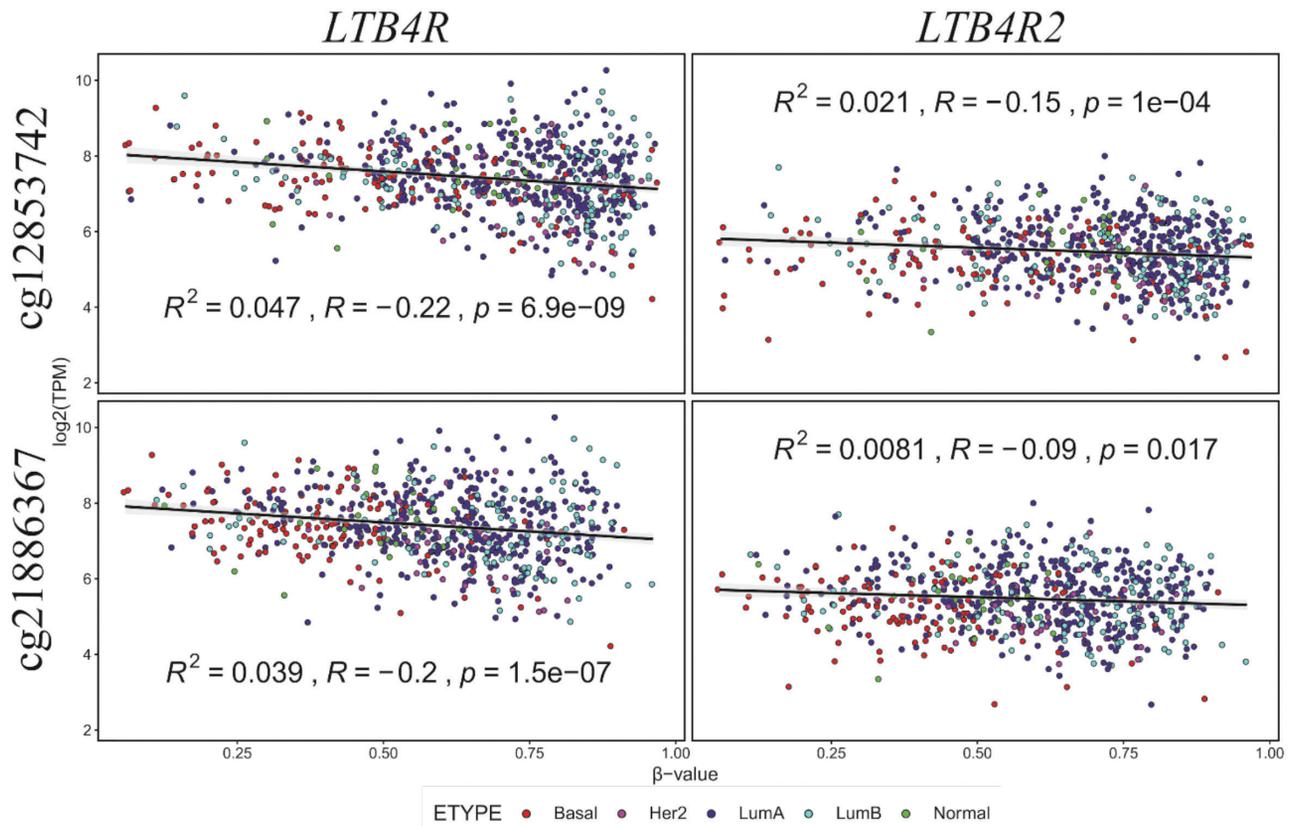


Рис. 4. Сравнение уровней экспрессии и метилирования генов *LTB4R*/*LTB4R2*, определенной зондами cg12853742 и cg21886367 (корреляция Спирмена). По оси абсцисс – уровень метилирования (β -value). По оси ординат – уровень экспрессии генов *LTB4R* и *LTB4R2*. ETYPE соответствует экспрессионному молекулярному подтипу РМЖ по PAM50. R^2 - коэффициент детерминации, R - коэффициент корреляции.

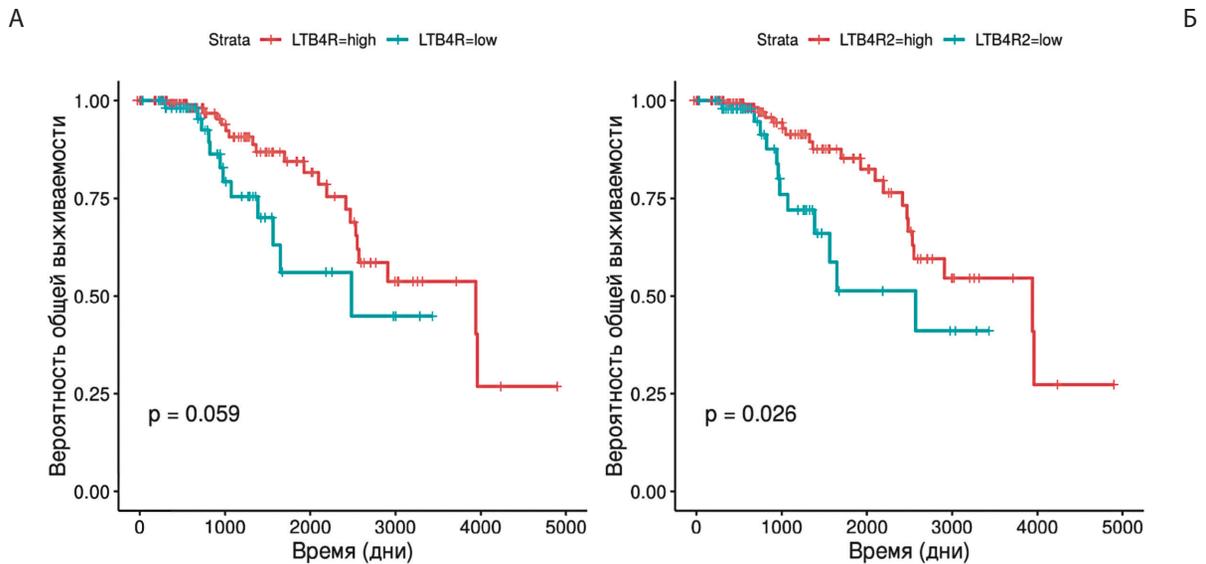


Рис. 5. Кривые Каплана-Мейера для пациенток с высоким и низким уровнем экспрессии генов *LTB4R* и *LTB4R2* в образцах молекулярного подтипа LumB РМЖ. Красным цветом отображается высокая экспрессия, зеленым – низкая. **А** – логранговый критерий не выявил отличий между кривыми дожития. **Б** – при низкой экспрессии *LTB4R2* наблюдается снижение выживаемости, что подтверждается статистически значимым p-value.

ду экспрессией и метилированием для обоих зондов (cg21886367 и cg12853742), расположенных в дифференциально метилированном участке CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2* (рис. 4).

Чтобы получить прогностическую информацию о связи экспрессии генов *LTB4R/LTB4R2* с выжива-

емостью пациенток с различными молекулярными подтипами РМЖ, был выполнен анализ кривых Каплана–Мейера.

Для подтипа LumВ статистически значимый результат ($p < 0,05$) достигается в зависимости от уровня экспрессии гена *LTB4R2*: в группе с низкой экспрес-

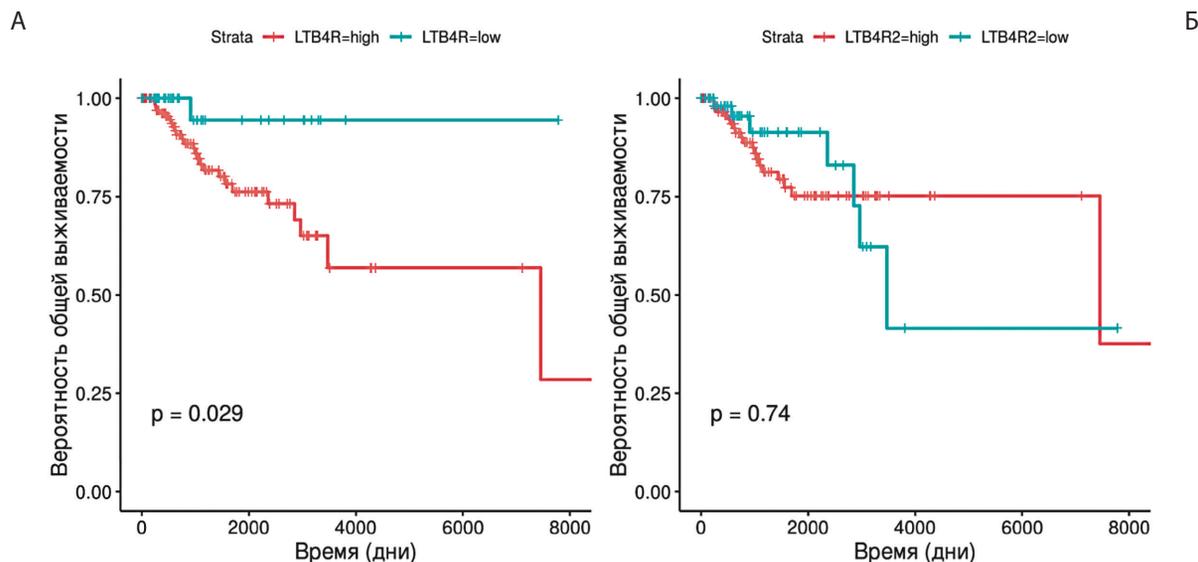


Рис. 6. Кривые Каплана-Мейера для пациенток с высоким и низким уровнем экспрессии генов *LTB4R* и *LTB4R2* в образцах молекулярного подтипа TH РМЖ. Красным цветом отображается высокая экспрессия, зеленым – низкая. **А** – логранговый критерий выявил статистически значимое отличие между кривыми дожития, высокая экспрессия *LTB4R* ассоциирована с худшей выживаемостью. **Б** – логранговый критерий не выявил статистически значимого отличия между кривыми для гена *LTB4R2*.

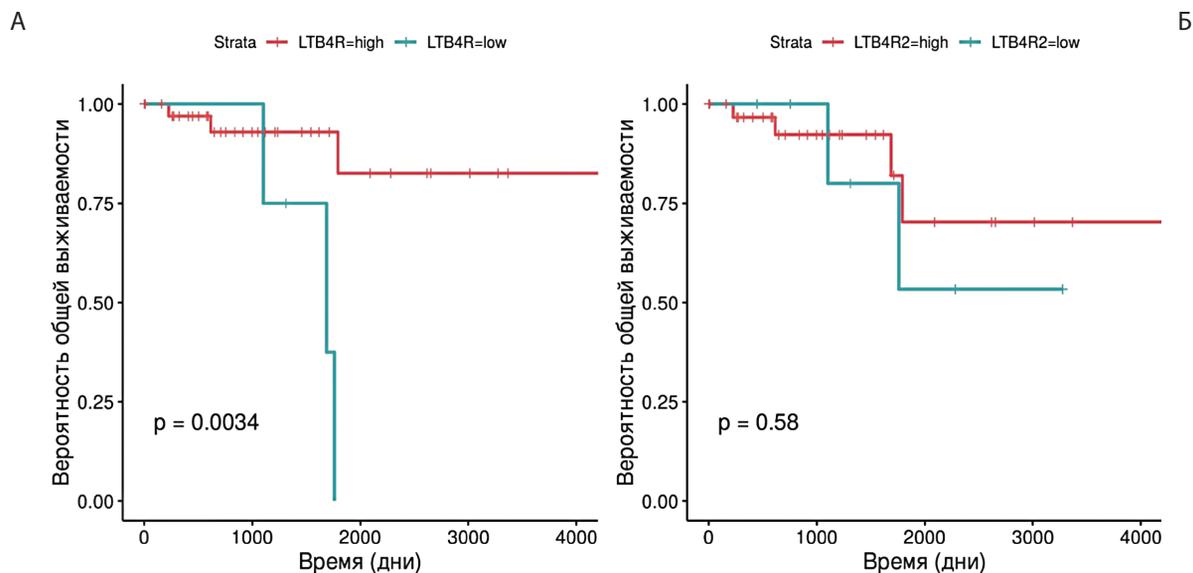


Рис. 7. Кривые Каплана-Мейера для пациенток с высоким и низким уровнем экспрессии генов *LTB4R* и *LTB4R2* в образцах нормально-подобного молекулярного подтипа РМЖ. Красным цветом отображается высокая экспрессия, зеленым – низкая. **А** – логранговый критерий выявил статистически значимое отличие между кривыми дожития, низкая экспрессия *LTB4R* ассоциирована с худшей выживаемостью. **Б** – логранговый критерий не выявил статистически значимого отличия между кривыми.

сией *LTB4R2* в опухолях ($LTB4R2 = low$) выживаемость существенно ниже (рис. 5Б), чем в группе с высоким уровнем экспрессии гена *LTB4R2* ($LTB4R2 = high$). При визуальном исследовании кривых Каплана-Мейера наблюдается снижение выживаемости в группе с низкой экспрессией *LTB4R*, но данное наблюдение статистически не достоверно (рис. 5А).

Анализ данных дожития выявил статистически значимый результат ($p < 0,05$) для молекулярного подтипа ТН РЖМ в зависимости от уровня экспрессии гена *LTB4R*. Данный результат говорит о худшей выживаемости пациенток с высоким уровнем экспрессии *LTB4R* в опухолях ($LTB4R = high$) (рис. 6А).

В группе больных РМЖ с нормально-подобным подтипом анализ кривых Каплана-Мейера показал статистически значимое отличие ($p < 0,05$) в зависимости от уровня экспрессии гена *LTB4R*: группа пациенток с низкой или отсутствующей экспрессией *LTB4R* в опухолях ($LTB4R = low$) показывает сниженную выживаемость пациенток с нормально-подобным подтипом РМЖ (рис. 7А).

Проведенный анализ кривых выживаемости пациенток с различными молекулярными подтипами РМЖ позволяет предположить, что экспрессия генов *LTB4R/LTB4R2* является новым потенциальным прогностическим маркером, однако его использование требует правильного определения молекулярного подтипа РМЖ, поскольку прогноз во многом зависит от иммуногистохимического подтипа.

Заключение

В результате проведенного исследования были изучены статус метилирования и прогностическая роль экспрессии генов лейкотриеновых рецепторов *LTB4R/LTB4R2* на результатах широкогеномного бисульфитного секвенирования XmaI-RRBS и данных из проекта TCGA-BCRA. Выявленные в образцах РМЖ различия уровней экспрессии *LTB4R/LTB4R2* дают возможность использовать их в будущем в качестве маркера чувствительности опухоли к ингибиторам лейкотриеновых рецепторов. Результаты тонкого картирования метилирования CpG-островка генов *LTB4R/LTB4R2* выявили дифференциально метилированные CpG-динуклеотиды, диагностическая и прогностическая значимость которых требует дальнейшего изучения. В случае выявления диагностической ценности состояния метилирования этих CpG-динуклеотидов, будет целесообразным создание тест-системы на основе анализа метилирования *LTB4R/LTB4R2*, которая может быть технически более приемлемой в клинической

и исследовательской практике по сравнению с определением экспрессии этих генов.

Благодарности/Acknowledgements

Высокопроизводительное секвенирование ДНК выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Геном» ФГБНУ «МГНЦ».

We would like to thank the staff of the Shared Resource Centre «Genome» of FSBI RCMG for the help with sequencing.

Литература

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians 2018; 68(6):394-424.
2. Bernhardt S.M., Dasari P., Walsh D. et al. Hormonal modulation of breast cancer gene expression: implications for intrinsic subtyping in premenopausal women. Frontiers in oncology 2016;6:1-16.
3. Garrido-Castro A. C., Lin N. U., Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. Cancer discovery 2019;9(2):176-198.
4. Криворотко П.В., Жильцова Е.К., Гиголаева Л.П. и др. Сравнительная характеристика различных схем неоадьювантной химиотерапии трижды негативного рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2017;13(4):19-23.
5. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al. Rapid and Affordable Genome-Wide Bisulfite DNA Sequencing by XmaI-reduced Representation Bisulfite Sequencing. Epigenomics 2017; 9(6): 833-847.
6. Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I. et al. Genome-wide methylation resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives. Epigenomics 2019; 11(6):605-617.
7. Wang D., DuBois R.N. Eicosanoids and cancer. Nature Reviews Cancer 2010;10(3):181-193.
8. Jeon W.K., Choi J., Park S.J. et al. The proinflammatory LTB4/BLT1 signal axis confers resistance to TGF- β 1-induced growth inhibition by targeting Smad3 linker region. Oncotarget 2015;6(39):41650-41666.
9. Choi J.A., Lee J.W., Kim H. et al. Pro-survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells is regulated by a BLT2-reactive oxygen species-linked signaling pathway. Carcinogenesis 2009;31(4):543-551.
10. Park G.S., Kim J.H. LPS up-regulates ICAM-1 expression in breast cancer cells by stimulating a MyD88-BLT2-ERK-linked cascade, which promotes adhesion to monocytes. Molecules and cells 2015;38(9):821-828.
11. Kim H., Choi J.A., Park G.S. et al. BLT2 up-regulates interleukin-8 production and promotes the invasiveness of breast cancer cells. PLoS One 2012;7(11):e49186.
12. Weinstein J.N., Collisson E.A., Mills G.B. et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. Nature genetics 2013;45(10):1113.
13. Tanas A.S., Kuznetsova E.B., Borisova M.E., Rudenko V.V., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Reduced representation bisulfite sequencing design for assessing the methylation of human CpG islands in large samples. Molecular Biology 2015;49(4):618-626.
14. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics 2002;18(11):1427-1431.
15. Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Нужный Е.П. и др. Эпигенетика болезни Фридрейха: метилирование области экспансии (GAA) n-повторов гена FXN. Вестник Российской академии медицинских наук 2019;74(2):80-87.

16. Zemliakova V.V., Strelnikov V.V., Zborovskaia I.B. et al. Abnormal methylation of p16/CDKN2A AND p14/ARF genes GpG Islands in non-small cell lung cancer and in acute lymphoblastic leukemia. *Molekuliarnaia biologiya*. 2004;38(6):966-972.
8. Jeon W.K., Choi J., Park S.J. et al. The proinflammatory LTB4/BLT1 signal axis confers resistance to TGF- β 1-induced growth inhibition by targeting Smad3 linker region. *Oncotarget* 2015;6(39):41650-41666.
9. Choi J.A., Lee J.W., Kim H. et al. Pro-survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells is regulated by a BLT2–reactive oxygen species-linked signaling pathway. *Carcinogenesis* 2009;31(4):543-551.
10. Park G.S., Kim J.H. LPS up-regulates ICAM-1 expression in breast cancer cells by stimulating a MyD88-BLT2-ERK-linked cascade, which promotes adhesion to monocytes. *Molecules and cells* 2015;38(9):821-828.
11. Kim H., Choi J.A., Park G.S. et al. BLT2 up-regulates interleukin-8 production and promotes the invasiveness of breast cancer cells. *PLoS One* 2012;7(11):e49186.
12. Weinstein J.N., Collisson E.A., Mills G.B. et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature genetics* 2013;45(10):1113.
13. Tanas A.S., Kuznetsova E.B., Borisova M.E., Rudenko V.V., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Reduced representation bisulfite sequencing design for assessing the methylation of human CpG islands in large samples. *Molecular Biology* 2015;49(4):618-626.
14. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002;18(11):1427-1431.
15. Abramycheva N.Yu., Fedotova E.Yu., Nuzhnyi E.P. et al. Epigenetika bolezni Fridreykha: metilirovaniye oblasti ekspansii (GAA)n-povtorov gena FXN [Epigenetics of Friedreich's Disease: Methylation of the (GAA)n-Repeats Region in FXN Gene]. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences]* 2019;74(2):80–87. (In Russ.)
16. Zemliakova V.V., Strelnikov V.V., Zborovskaia I.B. et al. Abnormal methylation of p16/CDKN2A AND p14/ARF genes GpG Islands in non-small cell lung cancer and in acute lymphoblastic leukemia. *Molekuliarnaia biologiya*. 2004;38(6):966-972.

References

1. Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68(6):394-424.
2. Bernhardt S.M., Dasari P., Walsh D. et al. Hormonal modulation of breast cancer gene expression: implications for intrinsic subtyping in premenopausal women. *Frontiers in oncology* 2016;6:1-16.
3. Garrido-Castro A. C., Lin N. U., Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer discovery* 2019;9(2):176-198.
4. Krivorotko P.V., Zhiltsova E.K., Gigolaeva L.P. et al. Sravnitel'naya kharakteristika razlichnykh skhem neoad'yuvantnoy polikhimioterapii trizhdy negativnogo raka molochnoy zhelezy [Comparative analysis of different neoadjuvant chemotherapy regimens for triple-negative breast cancer]. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy [Tumors of female reproductive system]*. 2017;13(4):19-23. (In Russ.)
5. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al. Rapid and Affordable Genome-Wide Bisulfite DNA Sequencing by XmaI-reduced Representation Bisulfite Sequencing. *Epigenomics* 2017; 9(6):833-847.
6. Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I. et al. Genome-wide methylation typing resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives. *Epigenomics* 2019; 11(6):605-617.
7. Wang D., DuBois R.N. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010;10(3):181-193.