

Медицинская ДНК-технология оценки чувствительности опухолей молочной железы люминального В подтипа к неоадьювантной химиотерапии с применением антрациклинов на основе маркеров метилирования ДНК

Сигин В.О.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,3}, Симонова О.А.¹, Жевлова А.И.¹, Литвяков Н.В.^{4,5},
Слонимская Е.М.⁴, Цыганов М.М.⁴, Володин И.В.¹, Шикеева А.А.¹,
Стрельников В.В.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,3}, Танас А.С.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, e-mail: sign.vladimir@gmail.com

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1, e-mail: tanas80@gmail.com

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

⁴ Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, 634009, пер. Кооперативный, д. 5, e-mail: nvlitv72@ya.ru

⁵ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050, пр. Ленина, д. 36, e-mail: nvlitv72@ya.ru

Цель. Разработать ДНК-технология прогноза эффективности неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) рака молочной железы (РМЖ) на основе определения состояния метилирования ограниченного набора маркеров метилирования ДНК методом многолокусной метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР). **Задачи.** (1) Провести широкогеномный анализ метилирования ДНК из биоптатов опухолей молочной железы до проведения НАХТ с применением антрациклинов. (2) Сформировать ограниченную панель маркеров метилирования ДНК, наиболее информативных с точки зрения прогноза эффективности НАХТ. (3) Разработать и оптимизировать лабораторный протокол многолокусной МЧ-ПЦР для определения статуса метилирования маркеров разработанной панели. (4) Оценить диагностические свойства полученной панели маркеров метилирования ДНК. **Материалы и методы.** Методом Xmal-RRBS проведён широкогеномный анализ 27 биопсийных образцов РМЖ люминального В подтипа, взятых до лечения под контролем УЗИ. По результатам Xmal-RRBS выбраны 10 генов, состояние метилирования промоторов которых наиболее эффективно маркирует эпигенетические подтипы опухолей с разным ответом на НАХТ. Состояние метилирования выбранных маркеров определяли методом МЧ-ПЦР с тремя пулами праймеров в выборке из 40 образцов ДНК биопсийных образцов РМЖ люминального В подтипа, взятых до лечения. Оценку диагностических свойств системы проводили методом ROC-анализа. **Результаты.** По данным широкогеномного анализа метилирования ДНК в качестве наиболее информативных маркеров чувствительности РМЖ к НАХТ с использованием антрациклинов определили участки генов *SLC9A3*, *C1QL2*, *DPYS*, *IRF4*, *ADCY8*, *KCNQ2*, *TERT*, *SYNDIG1*, *SKOR2* и *GRIK1*. Для проведения locus-специфического тестирования состояния метилирования этих маркеров разработали систему многолокусной МЧ-ПЦР. По результатам locus-специфического тестирования определили диагностические свойства системы: площадь под ROC-кривой составила 84%, чувствительность системы — 82% при специфичности 80%, точность — 82%. **Выводы.** Система, включающая ограниченное количество маркеров метилирования ДНК, позволяет эффективно прогнозировать ответ опухоли молочной железы люминального В подтипа на НАХТ с использованием антрациклинов по результатам анализа биопсийного материала, полученного до начала лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадьювантная химиотерапия, широкогеномный анализ метилирования ДНК, многолокусная метилчувствительная ПЦР.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Medical DNA technology for evaluating the sensitivity of luminal B breast tumors to neoadjuvant anthracycline chemotherapy based on DNA methylation markers

Sign V.O.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,3}, Simonova O.A.¹, Zhevlova A.I.¹, Litviakov N.V.^{4,5},
Slonimskaya E.M.⁴, Tsyganov M.M.⁴, Volodin I.V.¹, Shikееva A.A.¹,
Strelnikov V.V.^{1,2}, Zaletaev D.V.^{1,3}, Tanas A.S.^{1,2}

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechie St.1, e-mail: sign.vladimir@gmail.com

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St. 1, e-mail: tanas80@gmail.com

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St. 8, e-mail: zalnem@mail.ru

⁴ Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russian Federation, 634009, Kooperativny Lane, 5, e-mail: nvlitv72@ya.ru

⁵ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation, 634050, Lenin Ave, 36, e-mail: nvlitv72@ya.ru.

Objective. To develop a DNA technology for the prognosis of the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer (BC) based on the determination of the methylation state of a limited set of DNA methylation markers by the method of multilocus methylation sensitive restriction enzyme polymerase chain reaction (MSRE-PCR). **Material and methods.** The research workflow was as follows. (1) Carry out a genome wide DNA methylation analysis on biopsy samples of breast tumors prior to anthracycline neoadjuvant chemotherapy. (2) Develop a limited panel of DNA methylation markers, the most informative for the prognosis of the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy. (3) Develop and optimize the laboratory protocol of multi-locus MSRE-PCR for determining the methylation status of the markers in the panel. (4) Evaluate the diagnostic properties of the resulting panel of DNA methylation markers. Genome wide DNA methylation analysis of 27 BC biopsy specimens of the luminal B subtype, taken before the treatment under ultrasound guidance, was performed using the XmaI-RRBS method. According to the results of XmaI-RRBS, 10 genes have been selected, the state of methylation of the promoters of which most effectively marks epigenetic subtypes of tumors with different responses to neoadjuvant chemotherapy. Methylation status of the selected markers was next determined by MSRE-PCR with three primer pools in a sample of 40 BC biopsy specimens of the luminal B subtype taken before the treatment. Evaluation of the diagnostic properties of the system was carried out by ROC analysis. **Results.** By the genome wide DNA methylation analysis, the *SLC9A3*, *C1QL2*, *DPYS*, *IRF4*, *ADCY8*, *KCNQ2*, *TERT*, *SYNDIG1*, *SKOR2* and *GRIK1* gene regions were identified as the most informative markers of BC sensitivity to anthracycline neoadjuvant chemotherapy. To conduct locus-specific testing of the methylation status of these markers we have developed a multi-locus MSRE-PCR system. Based on the results of the locus-specific testing, the diagnostic properties of the system were determined: the area under the ROC curve was 84%, the sensitivity of the system was 82% with the specificity of 80%, the accuracy was 82%. **Conclusion.** The system including a limited number of DNA methylation markers, makes it possible to effectively predict the response of a luminal B subtype breast tumors to anthracycline neoadjuvant chemotherapy by an analysis of biopsy material obtained prior to treatment.

Key words. Breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, genome wide analysis of DNA methylation, multilocus methylation sensitive restriction enzyme PCR.

Введение

Предоперационная (неоадьювантная) химиотерапия (НАХТ) показана для использования у больных с местно-распространенным РМЖ IIA, IIIB, или IIIC стадиями и может применяться у пациентов с IIA (T_2N_0 или T_1N_1) или IIIB (T_2N_1 или T_3N_0) стадиями при трижды негативном, люминальном В, HER2-позитивном РМЖ и при наличии лимфогенных метастазов. Использование НАХТ продиктовано стремлением к уменьшению объема первичной опухоли, что создает условия для выполнения органосохранных операций или переводит опухоль в операбельное состояние. Кроме того, достижение полной морфологической регрессии способствует улучшению отдаленных результатов лечения. В связи с этим очень важно, чтобы у больных отмечался хороший ответ на химиотерапию (полная или частичная регрессия опухоли) [1], что делает актуальной разработку молекулярных маркеров, которые в идеале предсказывали бы чувствительность опухоли к НАХТ ещё до её начала, с использованием в качестве биологического материала биоптата опухоли.

Изучение прогностических факторов эффективности НАХТ, не зависящих от основных клиничко-патологических факторов прогноза, сосредоточено вокруг феномена множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), особенностей функционирования генов МЛУ и монорезистентности, определяющих чувствительность опухоли к отдельным химиопрепаратам, за счет участия в их метаболизме или являющимися мишенями химиотерапевтических средств [2, 3]. Было показано, что наличие делеций локусов генов МЛУ в опухоли молочной железы не позволяет полноценно функционировать транспортерам ксенобиотиков, осуществляющим удаление химиопрепаратов из опухолевых клеток, и ассоции-

ровано с хорошим ответом опухоли на НАХТ. Определение делеций локусов генов МЛУ может служить новым потенциальным предиктивным фактором [2, 3]. Также была показана взаимосвязь между метилированием генов МЛУ и различными эффектами НАХТ [4].

Маркеры метилирования ДНК характеризуются тем, что детекция аномального метилирования CpG-островков промоторов генов, отсутствующего в нормальных клетках, не требует применения количественных методов, чувствительность которых снижается в присутствии примеси нормальной ткани, и возможна с применением высокочувствительных качественных методов, таких, как МЧ-ПЦР [5]. Однако в настоящее время преимущества метилирования ДНК в качестве молекулярного маркера используются в недостаточной степени для проведения диагностики в клинической онкологии. Это объясняется недостатком хорошо изученных и охарактеризованных генов, аномальное метилирование которых достоверно связано с тем или иным патоморфологическим типом опухоли. В связи с этим особое значение приобретает идентификация и подробная характеристика особенностей метилирования новых геномных локусов, вовлеченных в канцерогенез.

Например, метилирование регуляторной области гена *PITX2* описано как предиктивный маркер ответа триждынегативного РМЖ на неоадьювантную химиотерапию антрациклинами и таксанами [6], показана значимость этого маркера в назначении неоадьювантного лечения для РМЖ других иммуногистохимических подтипов. Несмотря на неясную роль гена *PITX2* в развитии опухоли, известно, что он является транскрипционным фактором.

Показано что функциональный статус генов транскрипционных факторов может найти отражение в стату-

се метилирования промоторных CpG-островков регулируемых ими генов [7], таким образом, характеристика подтипов РМЖ по профилю метилирования может быть более устойчивым маркером в сравнении с определением отдельных маркеров. Ранее показана возможность эпигенетической классификации подтипов РМЖ на основе метилирования ДНК геномов опухолей [8]. Мы предполагаем, что профили метилирования могут быть различимы с использованием ограниченного набора маркеров метилирования ДНК, что позволит применить их в клинической диагностике.

Ранее нами была разработана технология широкогеномного анализа метилирования высокопроизводительным параллельным секвенированием библиотек фрагментов бисульфит-конвертированной ДНК, полученных гидролизом образцов эндонуклеазой XmaI — метод XmaI-RRBS [9–11]. Для подготовки геномных библиотек RRBS используются специфические эндонуклеазы рестрикции, формирующие пул CpG-богатых фрагментов ДНК. Метод включает проведение гидролиза геномной ДНК эндонуклеазой рестрикции XmaI, формирующей фрагменты с 5'-липким концом, частичное тупление концов полимеразной реакцией в присутствии 5'-me-dCTP, лигирование фрагментов с адаптерами с липким концом, комплементарным модифицированному частичным туплением липкому концу целевого фрагмента, отбор целевых фрагментов селекцией по длине фрагментов и амплификацию с праймерами, комплементарными адаптерам, секвенирование фрагментов библиотеки, картирование прочтений с учетом бисульфитного конвертирования ДНК, определение статуса метилирования отдельных CpG-пар. В настоящей работе метод XmaI-RRBS использован для широкогеномного поиска маркеров метилирования ДНК, различающих биопсийные образцы РМЖ, полученные до лечения, по эффективности последующей НАХТ с использованием антрациклинов.

Несмотря на эффективность метода RRBS с точки зрения разработки эпигенетических классификаторов типов злокачественных новообразований, возможность внедрения широкогеномного анализа метилирования ДНК в рутинную клиническую диагностическую практику в настоящее время не рассматривается. В связи с этим нами была поставлена цель разработать технологию прогноза эффективности НАХТ РМЖ на основе определения ограниченного набора маркеров метилирования ДНК методом многолокусной МЧ-ПЦР.

Материалы и методы

Клинический материал. Исследование проведено на 40 биопсийных образцах РМЖ люминального В подтипа, взятых до лечения под контролем УЗИ. НАХТ включала 2–4 курса по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода). Эффективность НАХТ оценивали по

критериям ВОЗ и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) с помощью УЗИ и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НАХТ и перед операцией. Регистрировали полную регрессию (100% уменьшение опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50%), стабилизацию (снижение объема менее чем на 50% или увеличение не более, чем на 25%) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25%). Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составили группу с отсутствием ответа на НАХТ, а больные с частичной и полной регрессией — группу с объективным ответом [1].

Биопсийные образцы помещали в раствор RNeasy lysis buffer (Qiagen, USA) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения ДНК.

Выделение и контроль качества ДНК. ДНК получали с использованием набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Концентрацию ДНК и чистоту выделения определяли на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (от 50 до 150 нг/мкл, A260/A280 = 2,10–2,35; A260/A230 = 2,15–2,40). Целостность ДНК оценивали капиллярным электрофорезом на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA), фрагменты ДНК имели массу более 48 kbp.

Широкогеномный анализ метилирования ДНК проводили по ранее описанной нами технологии [9] на приборе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher, США).

Гидролиз ДНК метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции. Для анализа метилирования участков индивидуальных генов, ДНК из образцов тканей обрабатывали метилчувствительной рестриктазой BstHNI (сайт узнавания GCG/C, Сибэнзим, Россия): 20 нг ДНК смешивали с 2 мкл реакционного 10x SE-буфера Y (Сибэнзим, Россия) и гидролизовали с добавлением 10 ед. акт. фермента в конечном объеме 20 мкл при температуре 50°C в течение ночи под слоем минерального масла.

Выбор участков генома для включения в диагностическую панель на основе МЧ-ПЦР. Анализ геномных последовательностей проводили с использованием компьютерных программ UCSC BLAT, UCSC Genome Browser, NCBI BLAST, с целью выявления возможности изучения статуса метилирования методом МЧ-ПЦР. Критерии выбора участков генома для включения в диагностическую панель на основе МЧ-ПЦР: колокализация целевого участка с областью фрагмента библиотеки XmaI-RRBS (между сайтами рестрикции XmaI), наличие трех сайтов узнавания BstHNI, длина ПЦР-продукта не более 200 п.н., протяженность фланкирующих целевой продукт участков ДНК, не содержащих сайтов узнавания BstHNI, — не менее 50 п.н.

Многолокусная МЧ-ПЦР. Дизайн праймеров проводили с использованием программы MPrimer 1.4. Согласно матрице совместимости в многолокусной ПЦР, праймеры разделили на 3 пула (P1, P2, P3). ПЦР проводили параллельно с интактными образцами ДНК и

образцами, предварительно гидролизованнами рестриктазой BstHNI.

Для внутреннего контроля полноты гидролиза ДНК (RC) использовали фрагмент гена *SNRK*, константно метилированный как в нормальных, так и в опухоле-

Таблица

Исучаемые геномные локусы, последовательности праймеров, их конечные концентрации в смеси ПЦР и длины полученных ампликонов

Пул праймеров	Локус	Последовательности праймеров 5' — 3'	Концентрация праймеров F + R, пМ	Размер продукта, п.н.
P1	<i>PC6_0*</i>	F: GTCGGCTCAGGGTCGCTGCTTGG R: GCTCTAGGCCCGCTTTCCCCGC	0,03 + 0,03	195
	<i>RC3_SNRK_5**</i>	F: CTGGAGGCCCTGCCCTTGCGG R: CGCCGCACTCGGCCCGCTCC	0,1 + 0,1	95
	<i>ATOH1_2*</i>	F: CTCGGTGCAGCTGGACGCTCTGC R: CCCGTCGCTTCTGTGGACCGAG	0,03 + 0,03	163
	<i>C1QL2_9</i>	F: GCATGACTTCCAGGGCGGCGGTG R: CCTGCCGCATGATCTGCGACCCT	0,04 + 0,04	105
	<i>CNIH3_2*</i>	F: TGTCCCGGGGCAGGAGGCAGTTC R: CGGGCCCTGCAGAGGGTGTCTTA	0,03 + 0,03	110
	<i>SLC9A3_5</i>	F: TTAGCGCGGCCAGAGTCGCTCCC R: CTGGGCCCTGGGGCTTCGTTGTG	0,03 + 0,03	122
	<i>SNAP25_2</i>	F: TAAGAGTCGCCCCGTGCGGGTGT R: AGCGAGGGCGGGAGGAAGTGG	0,04 + 0,04	148
P2	<i>PC5_ALDH4A*</i>	F: GTGACGGTGCCACTCACGTCGCC R: TTCCACTTCGTGCACCGCTCGGC	0,08 + 0,08	197
	<i>RC3_SNRK_8**</i>	F: GCCTGGAGGCCCTGCCCTTGC R: CGCCGCACTCGGCCCGCTCC	0,24 + 0,24	97
	<i>ADCY8_4</i>	F: GCCGGCGTGGGAGAGGACCACTG R: AACAGCGGAGGAACCGGCTGGCG	0,1 + 0,1	114
	<i>DPYS_4</i>	F: CATCGTTGACCACGCGACCCCG R: TCGGTGGGACCTTGCAGGAGGG	0,32 + 0,32	154
	<i>IRF4_3</i>	F: GCCTCGTGGCTGAAGGGCAGCTC R: AGCTACCGCGCTCATGCCGAAC	0,1 + 0,1	145
	<i>KCNQ2_7</i>	F: CCGGCGGCTGCAGAGATGGGAC R: AGCTGTCTGTCTGCCCCCTCGG	0,07 + 0,07	105
	<i>PRR5_4*</i>	F: CCCTGTTACAGCCTCCGATTCCTA R: CCCCAGGCCCTCTGCTGTCCCT	0,04 + 0,04	167
P3	<i>PC6_9*</i>	F: GTCGGCTCAGGGTCGCTGCTTGG R: AGGCCCGCTTTCCCCGCTTGAG	0,019 + 0,019	190
	<i>RC2_SNRK_6**</i>	F: CTCCGCCGCCTCAGTAGCCTCC R: AGCGCACTTACTTTCCGCCTGC	0,03 + 0,03	84
	<i>GRIK1_2</i>	F: GCAGTGACGCGGCTCCCCCTTTT R: CACCAACGCGGGTGTAGCGGGTC	0,015 + 0,015	124
	<i>PTGIS_8*</i>	F: GGAAGTCCGAAAGCAAGGCAGGG R: TCTGCGTGCCCGGGTGAAGAA	0,04 + 0,04	103
	<i>SKOR2_1</i>	F: CAGAGTCCGCGGGCGGCGTGGAG R: CCCCCGAGGTAGTGGCAACG	0,03 + 0,03	145
	<i>SYNDIG1_7</i>	F: CCGCTAGGGCCTCCCTGGTCTGG R: GAGCCGCTCCTCTCGCTTGCCG	0,02 + 0,02	152
	<i>TERT_3</i>	F: GCGGAGCTGGAAGGTGAAGGGGC R: GGAAGCGCGGCCAGACCC	0,027 + 0,027	168
Примечание. * — внутренний контроль эффективности ПЦР; ** — контроль полноты гидролиза				

вых образцах. В качестве внутреннего положительного контроля амплификации (PC) выбрали GC-богатые участки генома, не содержащие сайтов узнавания используемой рестриктазы, а также константно метилированные фрагменты генов.

ПЦР с пулами праймеров P1 и P2 проводили в 25 мкл смеси, содержащей 0,1 мкг геномной ДНК, 180 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 68 мМ Tris-HCl pH 8.3 при 25°C, 16,8 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 8% глицерин, 0,1 мг/мл BSA, 3 мМ и 4 мМ MgCl₂ для P1 и P2 соответственно, 1,5 ед. акт. термофильной ДНК-полимеразы, праймеры (таблица), до конечного объёма 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, 70°C — 40 с, 72°C — 40 с. Финальную элонгацию проводили 10 минут при 72°C.

Для амплификации P3 использовали наборы GenePak™ PCR Core (Изоген, Москва). В пробирку с лиофилизированным премиксом добавляли 10 мкл PCR Diluent, 0,1 мкг ДНК, праймеры (таблица), деионизированную воду до 20 мкл. ПЦР проводили под слоем минерального масла. Смесь прогревали при 95°C в течение 5 минут и проводили 33 цикла ПЦР с параметрами: 95°C — 40 с, 69°C — 40 с, 72°C — 40 с. Финальную элонгацию проводили 10 минут при температуре 72°C.

Продукты ПЦР разделяли в 8% полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра.

Классификатор метилотипов РМЖ строили на основе модели логистической регрессии. Параметры модели определяли по данным о статусе метилирования маркеров панели и принадлежности образца подтипу ответа на НАХТ. Качество классификатора определяли путем ROC-анализа (AUC — площадь под кривой, точности классификации).

Диагностическую ценность предложенной панели маркеров оценивали по показателям чувствительности и специфичности прогноза ответа на НАХТ.

Результаты

На 27 образцах РМЖ люминального В подтипа, взятых до лечения, проведён широкогеномный анализ метилирования ДНК методом XmaI-RRBS [8]. На основании полученных данных о состоянии метилирования свыше 100000 CpG-динуклеотидов выбраны позиции генома, дифференциальное метилирование которых наблюдается в группах образцов РМЖ, различающихся чувствительностью к НАХТ с использованием антрациклинов (рис. 1).

Руководствуясь наблюдением о совместном эпигенетическом поведении маркеров (кластеризацию маркеров можно наблюдать на рис. 1, по оси ординат), из каждой группы выбрали по одному, сформировав, таким образом, систему ограниченного набора маркеров метилирования ДНК, дискриминирующих опухоли молочной железы

в зависимости от их чувствительности к НАХТ. Топологически выбранные маркеры принадлежат участкам промоторных областей генов *SLC9A3*, *CIQL2*, *DPYS*, *IRF4*, *ADCY8*, *KCNQ2*, *TERT*, *SYNDIG1*, *SKOR2* и *GRIK1*.

Для определения состояния метилирования участков генов, которые были выбраны по результатам XmaI-RRBS как наиболее перспективные маркеры прогноза чувствительности РМЖ к НАХТ, сформирована тест-система на основе многолокусной МЧ-ПЦР, позволяющая проводить исследования в больших выборках биологического материала. С использованием МЧ-ПЦР мы проанализировали состояние метилирования участков 10 вышеперечисленных генов в 40 биопсийных образцах РМЖ, полученных до лечения. Пример визуализации результатов многолокусной МЧ-ПЦР представлен на рис. 2.

ROC-анализ полученного классификатора на основе 10 маркеров метилирования ДНК показал хорошее качество классификации метилотипов РМЖ (площадь под кривой AUC = 0,84). Точность разработанной тест-системы составила 82% (рис. 3). Определена диагностическая ценность прогноза эффективности НАХТ люминального В подтипа РМЖ антрациклинами: чувствительность — 80%, специфичность — 82%.

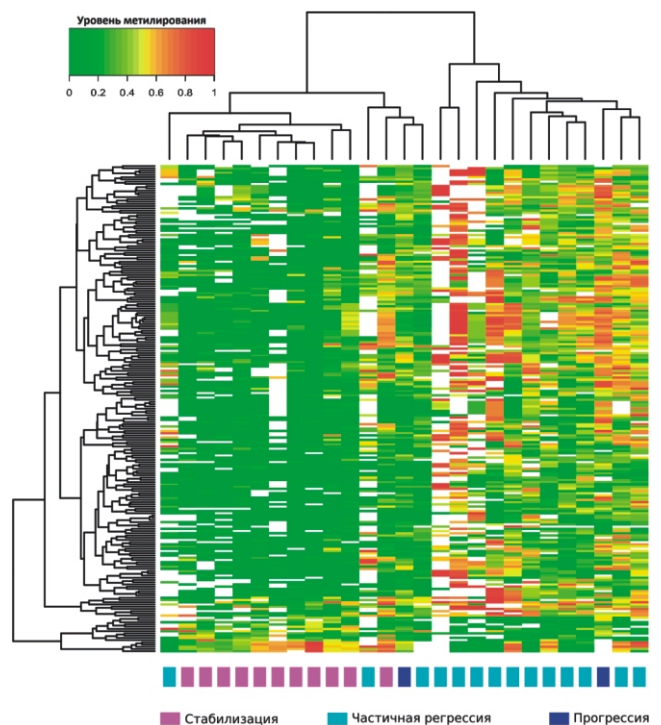


Рис. 1. Тепловая диаграмма уровней метилирования CpG-динуклеотидов в подтипах РМЖ с различной эффективностью НАХТ, определенных в настоящем исследовании по результатам анализа метилотипов методом XmaI-RRBS. Более тёплые цвета диаграммы отражают более высокий уровень метилирования. По оси абсцисс — образцы РМЖ, по оси ординат — CpG-динуклеотиды, дифференциальное метилирование которых маркирует различия ответов опухолей на НАХТ.

Обсуждение

Идентификация подтипов злокачественных новообразований, требующих разных подходов к лечению — актуальная проблема онкологии [3]. Для РМЖ уже существует классификация подтипов, основанная на измерении уровней экспрессии генов. Однако определение уровней экспрессии в клинических образцах осложняется клеточной гетерогенностью тканей и низким качеством препаратов РНК из архивных клинических образцов.

В качестве альтернативы системам маркеров генной экспрессии рассматривается возможность использования для классификации подтипов РМЖ профилей метилирования ДНК геномов опухолей. В настоящей ра-

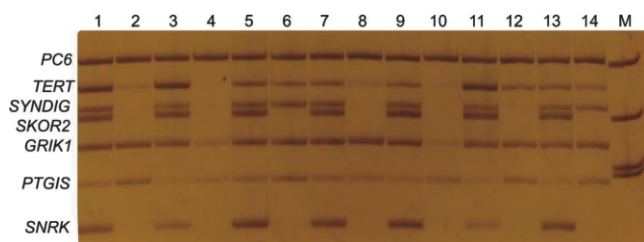


Рис. 2. Пример результатов практического использования разработанной тест-системы для проведения многолокусной МЧ-ПЦР с праймерами пула РЗ. В чётных дорожках — продукты ПЦР образцов ДНК опухолей, гидролизованных метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции BstNHI, в нечётных — продукты ПЦР интактных образцов ДНК опухолей. М — маркер молекулярной массы ДНК pUC19/MspI.

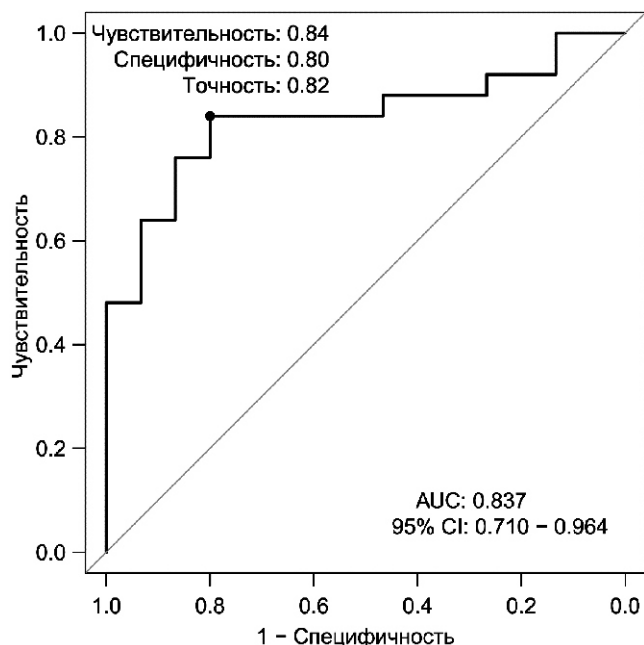


Рис. 3. Графическая характеристика качества классификатора подтипов РМЖ, различающихся чувствительностью к НАХТ с использованием антрациклинов, на основе 10 маркеров метилирования ДНК.

боте проведено широкогеномное исследование состояния метилирования ДНК образцов РМЖ, отобраны наиболее информативные маркеры метилирования и сформирована тест-система для анализа метилирования ограниченного набора маркеров метилирования ДНК. При разработке такой системы нами решался вопрос о выборе принципиального подхода к проведению locus-специфического анализа метилирования ДНК. Известными методами анализа метилирования ДНК в диагностических приложениях являются метилспецифическая ПЦР, включающая этап обработки ДНК бисульфитом натрия, и МЧ-ПЦР, основанная на гидролизе геномной ДНК метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции. Бисульфитная конверсия характеризуется как потеря большей части ДНК [12], что недопустимо в исследованиях с ограниченным количеством материала, так и неполной конверсией неметилированных цитозинов [13]. Учитывая высокую чувствительность [14], небольшую стоимость и быстроту получения результатов, за основу при разработке медицинской ДНК-технологии прогноза эффективности неоадьювантной химиотерапии РМЖ нами был принят метод МЧ-ПЦР.

Для определения дифференциального метилирования ДНК в выборке РМЖ оптимизирован протокол проведения мультиплексной МЧ-ПЦР. Мультиплексирование нескольких маркеров в одной реакции снижает требования к количеству материала для исследования (40 нг), что важно при проведении исследований с использованием материала биопсии опухоли. Добавление в реакцию двух типов контролей — положительного и контроля полноты гидролиза ДНК — позволяет повысить аналитическую чувствительность и специфичность по сравнению с методами, основанными на анализе бисульфит-конвертированной ДНК [15].

Разработанная тест-система на основе анализа метилирования 10 маркеров методом многолокусной МЧ-ПЦР показала хорошее качество классификации метилотипов образцов РМЖ, различающихся чувствительностью к НАХТ с использованием антрациклинов. Перспективы клинического использования разработанной тест-системы будут определяться дополнительной валидацией на независимых выборках аннотированных образцов РМЖ.

Заключение

В результате проведенного исследования сформирована панель из 10 маркеров метилирования ДНК, которая с высокой точностью определяет метилотипы РМЖ. Метилотип РМЖ, определяемый с использованием разработанной панели маркеров, может быть использован в качестве маркера ответа на НАХТ, который позволяет предсказать объективный ответ на НАХТ или отсутствие ответа на предоперационную химиотерапию антрациклинами у больных люминальным В РМЖ. Лабораторный протокол мультиплексной МЧ-ПЦР для определения дифференциального метилирования генов, разли-

чающих метилотипы РМЖ, технически соответствует возможностям клинических лабораторий, осуществляющих молекулярно-генетическую диагностику. За счёт снижения требований к количеству материала образца значительно расширены возможности использования протокола в диагностике онкологических заболеваний.

Список литературы

1. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., et al. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19(5): 1508-1516.
2. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska Julia, Choinzonov E.L. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7(7): 7829-7841.
3. Казанцева П.В., Цыганов М.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Ибрагимова М.К., Дорошенко А.В., Тарабановская Н.А., Паталяк С.В. Молекулярно-генетические маркеры эффективности неoadъювантной химиотерапии с применением антрациклинов у больных раком молочной железы. *Сибирский онкологический журнал.* 2016; 15(2): 29-35.
4. М.М. Цыганов, А.Г. Щербакова Метилирование промоторов генов множественной лекарственной устойчивости в опухолевой ткани молочной железы и эффект неoadъювантной химиотерапии. *Сибирский онкологический журнал.* 2012; 172-173
5. Стрельников В.В. Основные направления молекулярно-генетических исследований в онкологии // *Медицинская генетика.* — 2012. — №10
6. Aubele M. et al. The Predictive Value of PITX2 DNA Methylation for High-Risk Breast Cancer Therapy: Current Guidelines, Medical Needs, and Challenges // *Disease Markers.* — 2017. — Т. 2017.
7. Akiyama Y. et al. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer // *Molecular and cellular biology.* — 2003. — Т. 23. — №. 23. — С. 8429-8439.
8. Cancer Genome Atlas Network Et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2012; 490(7418): 61-70
9. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B., Rudenko V.V., Karandasheva K.O., Nemtsova M.V., Izhevskaya V.L., Simonova O.A., Larin S.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Rapid and Affordable Genome-Wide Bisulfite DNA Sequencing by XmaI-reduced Representation Bisulfite Sequencing. *Epigenomics.* 2017; 9(6): 833-847.
10. Стрельников В.В., Танас А.С., Руденко В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Геномный анализ метилирования ДНК с использованием секвенирования нового поколения. *Медицинская генетика.* 2014; 13(3): 32-37.
11. Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Борисова М.Э., Руденко В.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Дизайн метода бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS) для анализа метилирования CpG-островков человека в больших выборках. *Молекулярная биология.* 2015; 49(4): 689-699.
12. Raizis A. M., Schmitt F., Jost J. P. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Analytical biochemistry.* 1995; 226(1): 161-166.
13. Olova N., Krueger F., Andrews S., Oxley D.O., Branco M.R., Reik W. Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. *bioRxiv.* 2017: 165449.
14. Melnikov A.A., Gartenhaus R.B., Levenson A.S., Motchoulskaya N.A., Levenson V.V. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic acids research.* 2005; 33(10): e93.
15. Стрельников В.В., Танас А.С., Кузнецова Е.Б. Методология локус-специфического анализа метилирования ДНК. Издательство: LAP Lambert Academic Publishing. ISBN 9783659670411; 2014; 104 С.