

DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-41-54

УДК: 618.19-006.6:577.21

Для цитирования: Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Поздняков П.И., Дубинин Е.В., Карпов А.Б., Вихлянов И.В., Никитин М.К., Солдатова С.М., Нетесова Н.А. Применение GLAD-ПЦР-анализа для изучения метилирования ДНК в регуляторных областях генов-онкосупрессоров при раке молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(6): 41–54. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-41-54

For citation: Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Pozdnyakov P.I., Dubinin E.V., Karpov A.B., Vihlyanov I.V., Nikitin M.K., Soldatova S.M., Netesova N.A. GLAD-PCR assay of DNA methylation sites in regulatory regions of some tumor-suppressor genes in breast cancer. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(6): 41–54. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-41-54

ПРИМЕНЕНИЕ GLAD-ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ-ОНКОСУПРЕССОРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Н.А. Сметанникова¹, М.А. Абдурашитов², А.Г. Акишев², П.И. Поздняков¹,
Е.В. Дубинин³, А.Б. Карпов^{4,5}, И.В. Вихлянов⁶, М.К. Никитин⁶,
С.М. Солдатова⁷, Н.А. Нетесова¹**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»»

Роспотребнадзора, г. Новосибирск, Россия¹

Россия, 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово. E-mail: smetannikova@vector.nsc.ru¹

ООО «СибЭнзайм», г. Новосибирск, Россия²

Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12²

ООО «ЭпиДжин», г. Новосибирск, Россия³

Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, 18³

ФГУП «Северский биофизический научный центр» ФМБА России, г. Северск, Россия⁴

Россия, 636039, г. Северск, Коммунистический пр-т, 87⁴

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия⁵

Россия, 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2⁵

КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», г. Барнаул, Россия⁶

Россия, 656045, г. Барнаул, ул. Змеиногорский тракт, 110к⁶

ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр» ФМБА России, г. Северск, Россия⁷

Россия, 636000, г. Северск, ул. Мира, 4⁷

Аннотация

Аберрантное метилирование ДНК на начальных стадиях канцерогенеза приводит к инактивации ряда генов и показано для многих онкологических заболеваний. Ранее с помощью метода GLAD-ПЦР анализа нами были выявлены аберрантно метилированные сайты R(5mC)GY, которые могут рассматриваться как эпигенетические маркеры при диагностике колоректального рака, рака легкого и рака желудка. При раке молочной железы, по литературным данным, наблюдается метилирование регуляторных участков генов *ALX4*, *BMP2*, *CCND2*, *CDH13*, *CDX1*, *FOXA1*, *GALR1*, *GATA5*, *GREM1*, *HIC1*, *HMX2*, *HS3ST2*, *HOXC10*, *ICAM5*, *LAMA1*, *RARB*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *RXRG*, *RYR2*, *SFRP2*, *SOX17*, *TERT* и *ZNF613*. В настоящей работе было проведено определение аберрантно метилированных сайтов RCGY в регуляторных участках данных генов в препаратах ДНК из тканей рака молочной железы. Анализ образцов ДНК из операционного материала опухолей (n=30) и морфологически неизмененных тканей молочной железы (n=22) показал высокую диагностическую эффективность панели маркеров, включающей сайты R(5mC)GY в составе генов *CCND2*, *BMP2*, *GALR1*, *SOX17*, *HMX2* и *HS3ST2*: суммарные показатели чувствительности и специфичности составляют 90,0 и 100,0 % соответственно.

Ключевые слова: рак молочной железы, гены-онкосупрессоры, метилирование ДНК, GLAD-ПЦР-анализ.

GLAD-PCR ASSAY OF DNA METHYLATION SITES IN REGULATORY REGIONS OF SOME TUMOR-SUPPRESSOR GENES IN BREAST CANCER

**N.A. Smetannikova¹, M.A. Abdurashitov², A.G. Akishev², P.I. Pozdnyakov¹,
E.V. Dubinin³, A.B. Karpov^{4,5}, I.V. Vihlyanov⁶, M.K. Nikitin⁶, S.M. Soldatova⁷,
N.A. Netesova¹**

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia¹

630559, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia¹

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk, Russia²

2/12, Ac. Timakov Street, 630117, Novosibirsk, Russia²

EpiGene Ltd, Novosibirsk, Russia³

18, Inzhenernaya Street, 630090, Novosibirsk, Russia³

Seversk Biophysical Research Centre, Seversk, Russia⁴

87, Kommunisticheskiy Ave., 636039, Seversk, Russia⁴

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia⁵

2, Moskovskiy Trakt, 634050, Tomsk, Russia⁵

Altai Regional Oncology Center, Barnaul, Russia⁶

110k, Zmeinogorskiy Trakt, 656045, Barnaul, Russia⁶

Siberian Federal Research and Clinical Centre, Seversk, Russia⁷

4, Mira Street, 636000, Seversk, Russia⁷

Abstract

Hypermethylation of the RCGY sites is shown for many cancer diseases. Such aberrant methylation, suppressing the gene activity, occurs at early stages of carcinogenesis. Recently, using GLAD-PCR assay, we have detected aberrantly methylated RCGY sites, which can be considered to be epigenetic markers of colorectal, lung, and gastric cancers. In breast cancer, methylation of the regulatory regions of *ALX4*, *BMP2*, *CCND2*, *CDH13*, *CDX1*, *FOXA1*, *GALR1*, *GATA5*, *GREM1*, *HIC1*, *HMX2*, *HS3ST2*, *HOXC10*, *ICAM5*, *LAMA1*, *RARB*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *RXRG*, *RYR2*, *SFRP2*, *SOX17*, *TERT*, and *ZNF613* tumor-suppressor genes is reported. In the present work, we determined aberrantly methylated RCGY sites in the regulatory regions of these genes in DNA preparations from breast cancer tissues. The study of DNA samples from 30 tumor and 22 normal mammary tissue samples demonstrates a high diagnostic potential of selected R(5mC)GY sites in regulatory regions of *CCND2*, *BMP2*, *GALR1*, *SOX17*, *HMX2*, and *HS3ST2* genes with total index of sensitivity and specificity for R(5mC)GY detection in tumor DNA 90.0 % and 100.0 %, respectively.

Key words: breast cancer, tumor-suppressor genes, DNA methylation, GLAD-PCR assay.

Введение

В 2020 г. рак молочной железы (РМЖ) стал наиболее распространенным злокачественным новообразованием во всем мире: ~2,3 млн выявленных случаев составили 11,7 % от всех впервые зарегистрированных случаев рака. По числу летальных исходов (более 685 тыс.) РМЖ вышел на пятое место в структуре общей смертности от онкологических заболеваний [1]. Основная причина высокой смертности заключается в том, что в 40–70 % случаев диагностируется РМЖ III–IV стадий, что определяет неблагоприятный прогноз [2]. При раннем выявлении (стадии IA–IIB) РМЖ пятилетняя выживаемость достигает 99 % [3].

Наиболее перспективным направлением ранней диагностики РМЖ считается эпигенетический анализ: определение в ДНК опухолевых клеток метильных групп, присоединенных к цитозинным основаниям в регуляторных участках генов-

онкосупрессоров, уровень экспрессии которых при этом значительно снижается. Данная модификация геномной ДНК обнаруживается уже на начальных стадиях канцерогенеза, что имеет решающее значение для раннего выявления онкологических заболеваний, включая РМЖ [4].

Абerrантное метилирование ДНК с образованием 5-метилцитозина (5mC) осуществляется ДНК-метилтрансферазами Dnmt3a и Dnmt3b, узнающими преимущественно сайт RCGY (где R – А или G, Y – Т или С). В результате в обеих цепях ДНК возникает модифицированная последовательность R(5mC)GY [5]. Способность метилзависимой ДНК-эндонуклеазы GluI специфически распознавать и расщеплять (как показано стрелкой) именно сайты R(5mC)↓GY позволила нам разработать способ идентификации сайта R(5mC)GY в конкретной позиции генома [6]. Данный метод, получивший название GLAD-ПЦР, мы впослед-

ствии применили для исследования статуса метилирования генов-онкосупрессоров в опухолевых тканях при колоректальном раке, раке легкого и желудка [7–10].

GLAD-ПЦР-анализ включает три стадии: 1) гидролиз ДНК ферментом *GlaI* (G); 2) присоединение к концам гидролизованной ДНК с помощью ДНК-лигазы (L) специфического адаптера (AD); 3) ПЦР в режиме реального времени (степень метилирования сайта R(5mC)GY определяет значение порогового цикла (Cq)) (рис. 1). На последнем этапе используются геномный праймер и флуоресцентный зонд, комплементарные участку ДНК вблизи определяемого сайта *GlaI*, и второй (гибридный) праймер с нуклеотидной последовательностью 5'-ССТГСТТТТСАТСГГYN-3', где пятнадцать 5'-концевых нуклеотидов соответствуют адаптеру, а четыре 3'-концевых нуклеотида комплементарны геномной последовательности в точке гидролиза ДНК ферментом *GlaI* [6].

Благодаря субстратной специфичности ДНК-эндонуклеазы *GlaI* метод GLAD-ПЦР позволяет определять сайт R(5mC)GY в заданном положении генома даже в условиях избытка молекул ДНК, где этот сайт неметилирован. GLAD-ПЦР-анализ характеризуется более высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов в сравнении с методиками, основанными на бисульфитной конверсии ДНК (часто сопровождаемой деградацией и значительными потерями исследуемого материала) либо использующими метил-чувствительные эндонуклеазы рестрикции (не способные распознавать частично метилированную ДНК – наиболее характерный паттерн метилирования CpG-островков на самых ранних стадиях канцерогенеза). К важным

преимуществам GLAD-ПЦР относятся также значительно меньшая трудоемкость и дороговизна исследования, отличающие применение специфичных метил-связывающих белков [6,11].

Целью исследования явилось применение GLAD-ПЦР-анализа для определения aberrантно метилированных сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в препаратах ДНК из тканей РМЖ.

Материал и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенные из тканей опухолей молочной железы, полученных в ходе оперативного вмешательства у 30 женщин в возрасте от 52 до 78 лет (средний возраст – 63,1 ± 1,3 года, s=6,7). Операционный материал собран в мае – августе 2017 г. в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (г. Барнаул) и КГБУЗ «Областной клинический онкологический диспансер» (г. Кемерово). У большинства пациенток диагностирован инвазивный протоковый рак (n=22) различной степени дифференцировки. В остальных случаях был выявлен инвазивный дольковый (n=7) или смешанный (n=1) рак. У 9 больных установлена I клиническая стадия РМЖ (T1N0M0), у 16 – II стадия (T0–1N1M0, T2–3N0–1M0), у 5 – III стадия (T0–2N2M0, T3N1–2M0, T4N0–2M0, T0–4N3M0).

В зависимости от иммуногистохимических характеристик 3 опухолевых образца были отнесены к люминальному подтипу А, включающему гормонозависимые опухоли, положительные по рецепторам эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП), не имеющие рецепторов эпидермального фактора роста HER2, с низким индексом пролифератив-

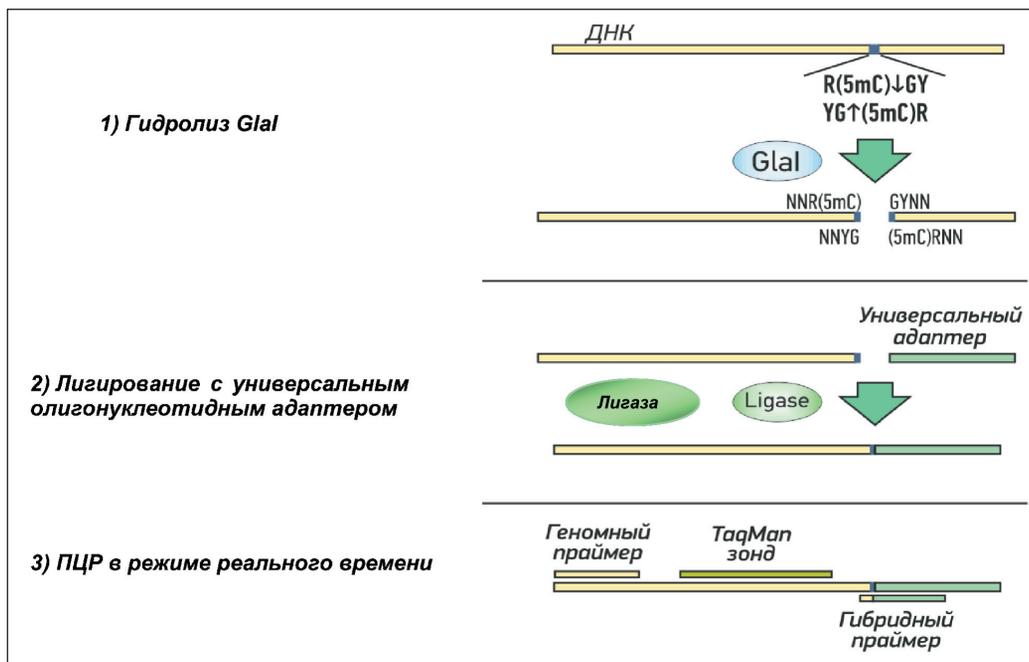


Рис. 1. Схема метода GLAD-ПЦР
Fig. 1. Scheme of the GLAD-PCR method

ной активности ($Ki67 < 20\%$). Для 17 образцов определен люминальный подтип В, включающий HER2-негативные опухоли с высоким индексом пролиферативной активности ($Ki67 \geq 20\%$), РЭ-положительные с низкими или отрицательными значениями РП, либо HER2-позитивные опухоли, РЭ-положительные с любыми значениями $Ki67$ и РП. Две опухоли были отнесены к HER2-позитивному подтипу (гормоннезависимые (РЭ-, РП-) с избытком рецепторов HER2), 8 – к тройному негативному подтипу (РЭ-, РП-, HER2-). В качестве сравнительного контроля были использованы образцы ДНК, выделенные из фрагментов морфологически неизмененных тканей молочной железы, взятых у 22 больных на значительном удалении от опухолевого очага, на линии резекции.

Неoadьювантную химиотерапию больные не получали вследствие малой степени распространенности опухолевого процесса либо наличия сопутствующих заболеваний, расцененных на момент планирования лечения как фактор, способный привести к утяжелению общего состояния. У всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

Каждый тканевой образец помещали в пробирку с раствором RNA-later и хранили в течение суток в холодильнике при температуре $+4\text{ }^\circ\text{C}$, затем переносили в морозильную камеру и хранили при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Выделение и очистку ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции [7].

По результатам анализа опубликованных литературных данных нами был проведен предварительный отбор генов-онкосупрессоров, регуляторные области которых потенциально содержат метилированные сайты RCGY – эпигенетические маркеры РМЖ. При отборе учитывались следующие критерии: присутствие в регуляторной области гена минимум одного сайта RCGY; при наличии нескольких таких сайтов – расстояние между ними не менее 50 п.н., достаточное для одновременной гибридизации на данном участке ДНК геномного праймера и флуоресцентного зонда; возможность подбора для исследуемого участка ДНК праймера и зонда, теоретически не подверженных образованию вторичных структур, ауто- и кросс-димеров, а также гибридизации с последовательностью адаптера; GC-состав исследуемого участка ДНК, не превышающий 76%; уникальность нуклеотидной последовательности исследуемого участка ДНК (невхождение его в состав повторяющихся элементов генома).

На основании приведенных критериев мы сформировали исходную панель из 24 генов, содержащих потенциально метилированные сайты RCGY: *ALX4* [12], *BMP2* [13], *CCND2* [14], *CDH13* [15], *CDX1* [16], *FOXA1* [17], *GALR1* [18], *GATA5* [19], *GREMI* [14, 20], *HIC1* [21], *HMX2* [22], *HS3ST2* [23], *HOXC10* [24], *ICAM5* [14], *LAMA1*

[25], *RARB* [26], *RASSF1A* [27], *RUNX3* [28], *RXRG* [29], *RYR2* [29], *SFRP2* [14, 30], *SOX17* [14], *TERT* [31], *ZNF613* [32].

Для исследования потенциальных эпигенетических маркеров РМЖ в составе регуляторных участков генов-онкосупрессоров подбирали специфичные системы праймеров и флуоресцентных зондов (табл. 1). Для этого использовали нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) по версии генома человека GRCh38.p13, семейство программ «Vector NTI 11.5» (Invitrogen, США) и онлайн-ресурс «BLAST» (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

В ходе предварительных экспериментов в регуляторной области каждого гена выявляли максимально метилированный сайт R(5mC)GY. Для всех сайтов RCGY, расположенных в пределах 200 п.н. от участка гибридизации геномного праймера и флуоресцентного зонда, определяли гибридные праймеры, комплементарные концевым тетра-нуклеотидам, получаемым после гидролиза последовательности NNR(5mC)↓GYNN. Наименьшее значение C_q в ПЦР в режиме реального времени указывало на максимальную степень метилирования сайта R(5mC)GY [6,7].

Для постановки всех этапов GLAD-ПЦР применяли реагенты производства ООО «Сибэнзайм». Ферментативный гидролиз ДНК проводили в течение 30 мин при $30\text{ }^\circ\text{C}$. Реакционная смесь (объемом 21,5 мкл) включала 9,0 нг ДНК исследуемого образца, $1 \times$ SE-буфер TMN (10 мМ Трис-HCl (pH 7,9), 5 мМ $MgCl_2$, 25 мМ NaCl), 2,0 % диметилсульфоксида (ДМСО), 2,0 мкг бычьего сывороточного альбумина (BCA) и 1,5 ед. акт. эндонуклеазы *GlaI*. Для лигирования продуктов гидролиза с адаптером (в объеме 30,0 мкл) к каждой пробе добавляли АТФ до конечной концентрации 0,5 мМ, универсальный двухцепочечный адаптер (5'-CCTGCTCTTTCATCG-3'/3'-p-GGACGAGAAAGTAGC-p-5', где p – фосфатная группа) до конечной концентрации 0,5 мкМ и 240 ед. акт. высокоактивной Т4-ДНК-лигазы. Реакцию проводили в течение 15 мин при $25\text{ }^\circ\text{C}$. На заключительной стадии в реакционную смесь вносили компоненты ПЦР до следующих концентраций в конечном объеме 60,0 мкл: $1 \times$ SE-буфер GLAD (50 мМ Трис- SO_4 (pH 9,0), 30 мМ KCl, 10 мМ $[NH_4]_2SO_4$), 3 мМ $MgCl_2$, смесь dNTP до 0,2 мМ каждого, 0,1 мкг/мкл BCA, соответствующую смесь двух праймеров и зонда до 0,4 мкМ каждого, 0,04 ед. акт./мкл SP Taq-ДНК-полимеразы. Для повышения эффективности амплификации GC-богатых участков генов *GATA5*, *GREMI*, *HIC1*, *ICAM5* и *RUNX3* в ПЦР-смесь дополнительно добавляли ДМСО до концентрации 4%. Затем по 20,0 мкл полученной смеси переносили в три отдельные микропробирки и проводили ПЦР в режиме реального времени в детектирующем амплификаторе «CXF-96» (Bio-Rad Lab., США) по программе:

Таблица 1/ Table 1

Геномные праймеры и флуоресцентные зонды, применявшиеся для исследования генов, потенциально содержащих онкомаркеры РМЖ

Genomic primers and fluorescent probes used to study genes potentially containing breast cancer tumor markers

Ген ^a / Gene ^a	Наименование белкового продукта ^a / Protein product name ^a	Хромосомная локализация гена ^a / Chromosomal gene localization ^a	Структура геномных праймеров/ флуоресцентных зондов ^b / Structure of genomic primers/fluorescent probes ^b
ALX4	ALX homeobox 4	11p11.2	CGTCAACAACCTCTCATCC FAM-TCCATTCTTATTTTCAGTTTGCCACCA-BHQ1
BMP2	bone morphogenetic protein 2	20p12.3	CGAGTTGCGGCTGCTCAGC FAM-CCTGAAACAGAGACCCACCCCGAGC-BHQ1
CCND2	cyclin D2	12p13.32	GAAAGGCAACCCCCCAA FAM-CGTCTTGGCCTCAGTCCCGC-BHQ1
CDH13	cadherin 13	16q23.3	GCTGGCTGGCGAGGCAGA FAM-CCTCTCCTCAAAGCTGGCTCCAC-BHQ1
CDX1	caudal type homeobox 1	5q32	CAGCTTCGCTGGCATTCCG FAM-CCCCCTCCAGACTTTAGCCCGGTGC-BHQ1
FOXA1	forkhead box protein A1	14q21.1	FAM-TCTCCTTCCATCTTGGCCTCGGCTC-BHQ1 AGAGGCTGGGAGCTGGACGA
GALR1	galanin receptor 1	18q23	FAM-TGCAGCAGAGAAGCCCTCCACC-BHQ1 GGCGAGAGCTTTTTGGGAGGC
GATA5	GATA binding protein 5	20q13.33	FAM-CCGAGCCCGCAGCCCC-BHQ1 CCCCTCGATGCTGTCTACCTGT
GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist	15q11-13	FAM-CTCCGCCACTCATCCCTGCC-BHQ1 GAGCGGTCTGGGTTGGTT
HIC1	hypermethylated in cancer 1	17p13.3	FAM-CTTGATGTCGTCGCCGTCGCCG-BHQ1 GGCTGGGGTCTCGTGCTA
HMX2	H6 family homeobox 2	10q26.13	CCAAGGGTCCAAGGATCGG FAM-CCGCAGCCGCCAGGAACCCG-BHQ1
HS3ST2	heparan sulfate-glucosamine 3-O-sulfotransferase 2	16p12.2	GCCTCCCGGAGGAGTACTATGCC FAM-CACCTTCGTTTACC GCCCAAAGC-BHQ1
HOXC10	homeobox protein C10	12q13.13	GAGGGGGCAGGGGAGAG FAM-CCCAGGAGGCCAGACCATTTC-BHQ1
ICAM5	intercellular adhesion molecule 5	19p13.2	FAM-CTCCCTCCAGGCCCGCC-BHQ1 AGGGGAAGAGTCCCGAGCTC
LAMA1	laminin, alpha 1	18p11.31	FAM-CTGACCGCGCCCTCC-BHQ1 CCACCTTCTGCCCCACCTCTA TTCAGAGGCAGGAGGGTCTATTC
RARB	retinoic acid receptor, beta	3p24	FAM-TCCCAGTCTCAAACAGCTCGCATGG-BHQ1
RASSF1A	Ras association domain family member 1	3p21.31	ATGTCGGGGAGCCTGAG FAM-TGCCAGTCCCGAGCTCAAT-BHQ1
RUNX3	runt related transcription factor 3	1p36.11	CCGGGGAGGGAGGTGTGAA FAM-CCGTAGACCAAGCACCAGCCGC-BHQ1
RXRG	retinoid X receptor, gamma	1q22-q23	GCCGCCGTCACCGTACT FAM-CCACCGCGTCTGCTGC-BHQ1
RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	1q43	FAM-TTCCCCCAAGTCAAGGTGCTGCGAAA-BHQ1 GGGACCACGGAGGCGACT
SFRP2	secreted frizzled related protein 2	4q31.3	CCAGCCCTCTCGGATTACCC FAM-CTCCCTTGCTCCCCCACCCTCC-BHQ1
SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	8q11.23	CGCCCTCCGACCCTCAA FAM-TCCCGGATTCCCGAGTGGCC-BHQ1
TERT	telomerase reverse transcriptase	5p15.33	FAM-CTCCCTGCAACTTCCCGCGA-BHQ1 AAAGAGAAATGACGGGCTGTCTC
ZNF613	zinc finger protein 613	19q31.41	GTGTTGCGGGGAGCTCTCG FAM-CCTCGCTCGGAGTTCGTTTCGAG-BHQ1

Примечание: ^a – обозначение, хромосомная локализация полное и наименование белковых продуктов генов приводятся согласно указаниям Международного комитета по номенклатуре генов – HUGO Gene Nomenclature Committee [33]; ^b – структура прямого или обратного геномного праймера приводится соответственно перед или после структуры зонда. В последовательности флуоресцентных зондов FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, BHQ1 – Black Hole Quencher 1.

Note: ^a – designation, chromosomal localization, and the full name of protein products of genes are given according to the instructions of the International Committee on Gene Nomenclature – HUGO Gene Nomenclature Committee [33]; ^b – the structure of the forward or reverse genomic primer is listed, respectively, before or after the structure of the probe. In the sequence of fluorescent probes FAM – 6-carboxyfluorescein, BHQ1 – Black Hole Quencher 1.

Сайты RCGY, отобранные для GLAD-ПЦР-анализа, их локализация в геноме и структура соответствующих им гибридных праймеров
RCGY sites selected for GLAD-PCR analysis, their localization in the genome and the structure of the corresponding hybrid primers

Ген/Gene	Сайт/Site	Координаты сайта ^a / Site coordinates ^a	Структура гибридного праймера ^b / Hybrid primer structure ^b
<i>ALX4</i>	ACGT	chr11:44304756-44304759	CCTGCTCTTTCATCGGTCC
<i>BMP2</i>	ACGC	chr20:6770341-6770344	CCTGCTCTTTCATCGGTCC
<i>CCND2</i>	GCGC	chr12:4274691-4274693	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>GALR1</i>	GCGC	chr18: 77249828-77249831	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>HMX2</i>	ACGC	chr10:123147940-123147943	CCTGCTCTTTCATCGGTCT
<i>HS3ST2</i>	GCGT	chr16:22814023-22814026	CCTGCTCTTTCATCGGCGG
<i>RARB</i>	ACGC	chr3: 25428374-25428377	CCTGCTCTTTCATCGGTTC
<i>SOX17</i>	GCGC	chr8: 54458724-54458727	CCTGCTCTTTCATCGGCCG
<i>ZNF613</i>	GCGC	chr19: 51887759-51887762	CCTGCTCTTTCATCGGCGT

Примечание: ^a – координаты сайта даны в соответствии с последней сборкой генома человека GRCh38.p13; ^b – подчеркнут 3'-концевой тетрануклеотид гибридного праймера, комплементарный последовательности ДНК в точке гидролиза GluI.

Note: ^a – Site coordinates are given according to the latest assembly of the human genome GRCh38.p13; ^b – The 3'-tetranucleotide of the hybrid primer complementary to the DNA sequence at the GluI hydrolysis point is underlined.

3 мин при 95 °C и 45 циклов – 10 с при 95 °C, 15 с при 61 °C, 20 с при 72 °C. Для устранения влияния возможных начальных флуктуаций на форму кривой амплификации флуоресценцию на первых пяти циклах ПЦР не детектировали.

Скрининг наиболее часто метилированных сайтов R(5mC)GY в составе регуляторных областей генов-онкосупрессоров проводили на ограниченных выборках из 10 препаратов ДНК, исследуя все образцы в трех повторах. Критерием отбора сайта для последующего анализа всей коллекции образцов ДНК опухолевых (n=30) и морфологически неизмененных тканей (n=20) больных РМЖ служило среднее значение $Cq \leq 30$, полученное по меньшей мере для одного из 10 образцов. Поскольку степень метилирования сайтов RCGY в регуляторных областях части исследуемых генов не удовлетворяла указанному критерию, из дальнейшей работы были исключены сайты в составе генов *CDH13*, *CDX1*, *FOXA1*, *GATA5*, *GREM1*, *HIC1*, *HOXC10*, *ICAM5*, *LAMA1*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *RXRG*, *RYR2*, *SFRP2* и *TERT*. Сайты R(5mC)GY, отобранные для исследования полной коллекции клинических образцов ДНК из тканей больных РМЖ, и соответствующие им гибридные праймеры приведены в табл. 2.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения «MedCalc 15.11» (MedCalc Software, Бельгия). Исходя из значений Cq в ПЦР в режиме реального времени, для анализируемых маркеров вычисляли точки отсечения – пороговые величины Cq , дифференцирующие положительные и отрицательные случаи. Результаты работы алгоритма визуализировали с помощью характеристических кривых (ROC-кривые; англ. Receiver Operating

Characteristic Curves) – графиков зависимости процента верно диагностированных положительных случаев (чувствительность) от процента ложноположительных случаев (100-специфичность) для различных возможных значений диагностического теста. Площадь под ROC-кривой (ППК) является интегральным показателем диагностической эффективности маркера (для «идеального» теста ППК=1) [34].

Для отбора оптимальной комбинации маркеров с максимальным суммарным значением ППК, которая дает возможность наиболее результативно дифференцировать образцы ДНК из опухолевых и морфологически неизмененных тканей, применяли метод логистической регрессии. Данный алгоритм позволяет анализировать связи между несколькими независимыми переменными (значения Cq , пропорциональные степени метилирования исследованных сайтов R(5mC)GY) и зависимой переменной (принадлежность образца к опухолевым или морфологически неизмененным тканям).

Результаты и обсуждение

На рис. 2 отображены результаты GLAD-ПЦР-анализа метилированных сайтов RCGY в препаратах ДНК из клинических образцов, на рис. 3 – ROC-кривые, полученные при статистической обработке данных GLAD-ПЦР девяти сайтов R(5mC)GY. В табл. 3 приведены числовые значения параметров, рассчитанных для каждого из исследованных маркеров: показателей чувствительности и специфичности, величины ППК, выраженной в виде доли от всей площади квадрата с указанием стандартной ошибки измерения, и 95 % доверительного интервала.

Характерным эпигенетическим нарушением при канцерогенезе является локальное гиперметилирование так называемых CpG-островков в регуляторных областях генов-онкосупрессоров, которые в норме не содержат метильных групп. В настоящее время показано, что подобное aberrантное метилирование характерно для начальных стадий большинства ненаследственных (спорадических) форм рака, составляющих в среднем более 90 % всех случаев злокачественных новообразований [4]. Описано большое количество генов с разнообразными биологическими функциями, регуляторные области которых характеризуются различиями уровня метилирования ДНК в клетках РМЖ и морфологически неизмененных тканей [14, 32].

GLAD-ПЦР-анализ сайтов R(5mC)GY в генах *ALX4*, *BMP2*, *CCND2*, *GALR1*, *HMX2*, *HS3ST2*, *RARB*, *SOX17* и *ZNF613* показывает, что значения Cq для маркеров *BMP2*, *CCND2*, *GALR1*, *HMX2*, *HS3ST2* и *ZNF613*, связанные отрицательной корреляционной зависимостью со степенью метилирования сайта [6], в большинстве образцов ДНК РМЖ в среднем на шесть и более циклов ниже значений Cq в образцах ДНК из морфологически неизмененных тканей. В то же время для маркера *ALX4* это различие минимально (менее 1,5 циклов), что обуславливает перекрытие диапазонов стандартных отклонений и делает невозможным использование данного маркера для выявления опухолевых тканей. Для сайтов R(5mC)GY в составе генов *SOX17* и *RARB* разность средних величин Cq для двух групп ДНК-образцов составляет около трех циклов, но в последнем случае отмечается большой разброс индивидуальных значений (рис. 2).

Статистический анализ результатов GLAD-ПЦР (рис. 3 и табл. 3) демонстрирует, что сайты R(5mC)GY в составе генов *CCND2*, *BMP2*, *GALR1*, *SOX17*, *HMX2* и *HS3ST2* характеризуются наиболее сбалансированным соотношением чувствительности и специфичности теста. Полученные значения ППК более 0,8 свидетельствуют, согласно общепринятым критериям оценки данных ROC, о высоком диагностическом потенциале указанных маркеров [34].

Комплексный анализ данных ROC с применением метода логистической регрессии показывает, что комбинация маркеров *CCND2*, *BMP2*, *GALR1*, *SOX17*, *HMX2* и *HS3ST2*, охватывая всю коллекцию исследованных образцов, дает максимальную величину ППК=0,988 и позволяет дифференцировать образцы ДНК из опухолевых и морфологически неизмененных тканей с наибольшей эффективностью. Как видно из табл. 3, суммарные показатели чувствительности и специфичности для панели эпигенетических маркеров РМЖ составляют соответственно 90,0 и 100 %.

Полученные результаты хорошо коррелируют с опубликованными ранее данными по метилированию генов в тканях РМЖ, полученными с

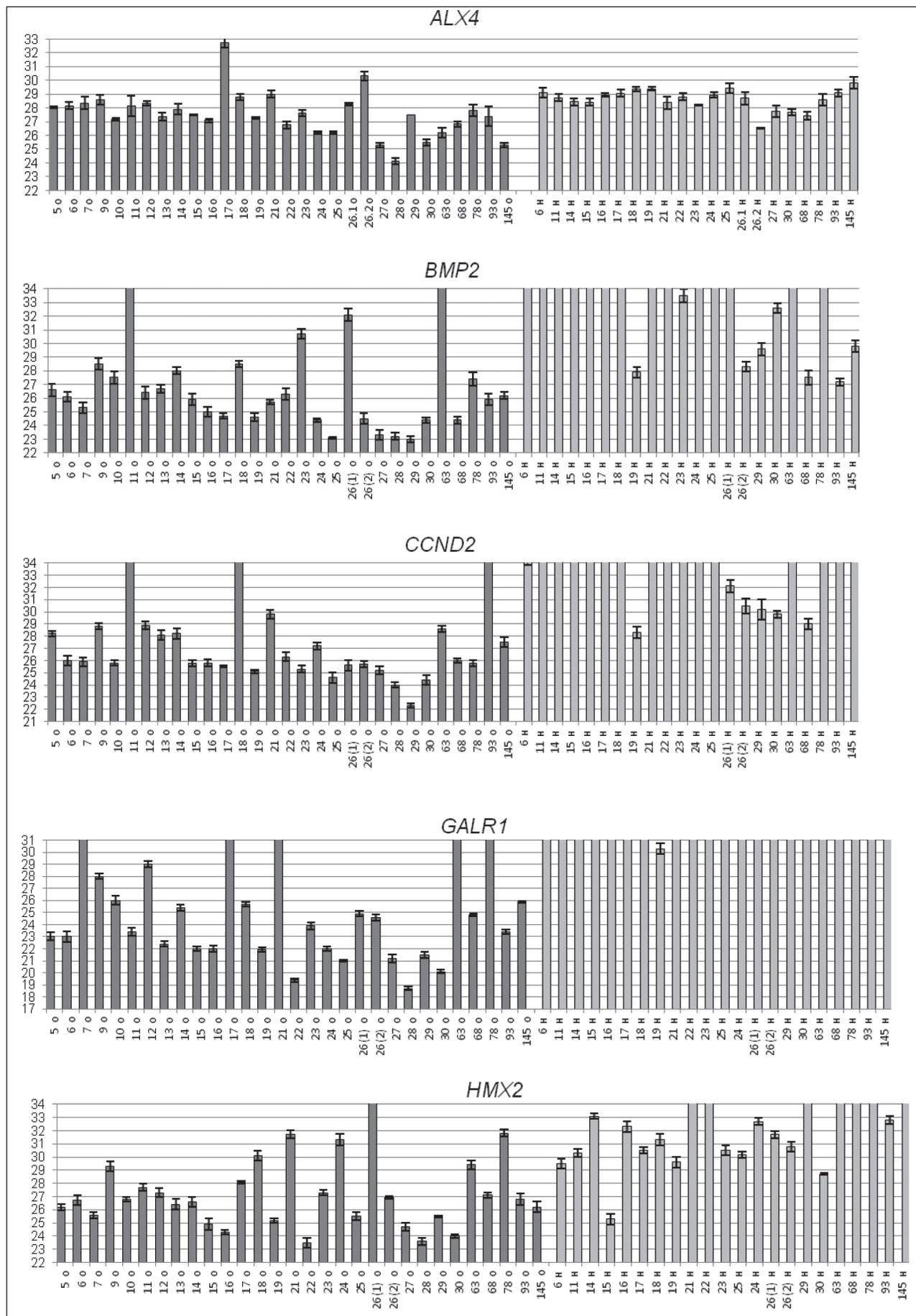
применением метода бисульфитной конверсии с последующим проведением метил-специфичной ПЦР [13, 23] либо секвенированием на NGS-платформе [14, 18, 22, 32]. При этом обращает внимание, что для 4 подтипов РМЖ, дифференцируемых по рецепторному статусу опухолей (люминальный А, люминальный В, HER2-позитивный, тройной негативный), обнаружены различия в профиле метилирования генов-онкосупрессоров, включая представленные в табл. 3 гены *CCND2*, *GALR1*, *SOX17*, *HMX2*, *HS3ST2* и *ZNF613* [14, 18, 22, 23, 26, 32].

Z. Li et al. показали, что aberrантное метилирование регуляторных участков генов *CCND2* и *SOX17* ассоциировано с развитием люминальных подтипов А и В [14]. Согласно данным S.K. Kassim et al., для люминального подтипа В характерно также гиперметилирование промотора гена *HS3ST2* [23]. В клетках РМЖ HER2-позитивного подтипа детектируется aberrантное метилирование генов *GALR1*, *SOX17* и *ZNF613* [14, 18, 32]. По данным C. Stirzaker et al., гиперметилирование промотора, обуславливающее инактивацию гена *HMX2*, является отличительным признаком тройного негативного подтипа РМЖ [22].

По результатам ROC-анализа данных GLAD-ПЦР, полученных нами при исследовании сайтов R(5mC)GY в вышеназванных генах, большинство исследованных образцов РМЖ по каждому из маркеров определяются как положительные (табл. 3). Это относится и к генам *GALR1*, *ZNF613* и *HMX2*, aberrантное метилирование которых ассоциировано с подтипами РМЖ, представленными в исследованной нами выборке значительным числом образцов. Отмеченное несоответствие может быть связано с тем, что в предшествующих работах оценивали статус метилирования всего пула CpG-динуклеотидов в составе изучаемых генов, в то время как метод GLAD-ПЦР выявляет сайты R(5mC)GY в конкретных позициях генома человека (табл. 2), метилирование которых может быть общим признаком всех подтипов РМЖ.

Выводы, сделанные в перечисленных исследованиях, основывались на сравнении средних значений степени метилирования ДНК в выборках образцов тканей без определения частотных показателей метилирования или экспрессии генов для групп «РМЖ» и «морфологически неизменная ткань». Такие данные описаны для генов *BMP2*, *RARB* и *ALX4*, также представленных в табл. 3.

M. Du et al. выявили значимое снижение уровня экспрессии мРНК *BMP2* в 23 из 32 (71,88 %) исследованных образцов тканей РМЖ, соответствующее высокой частоте (68,75 %) aberrантного метилирования регуляторной области гена [13]. Выполненное нами исследование показало абсолютную диагностическую специфичность сайта RCGY в составе гена *BMP2* – все образцы морфо-



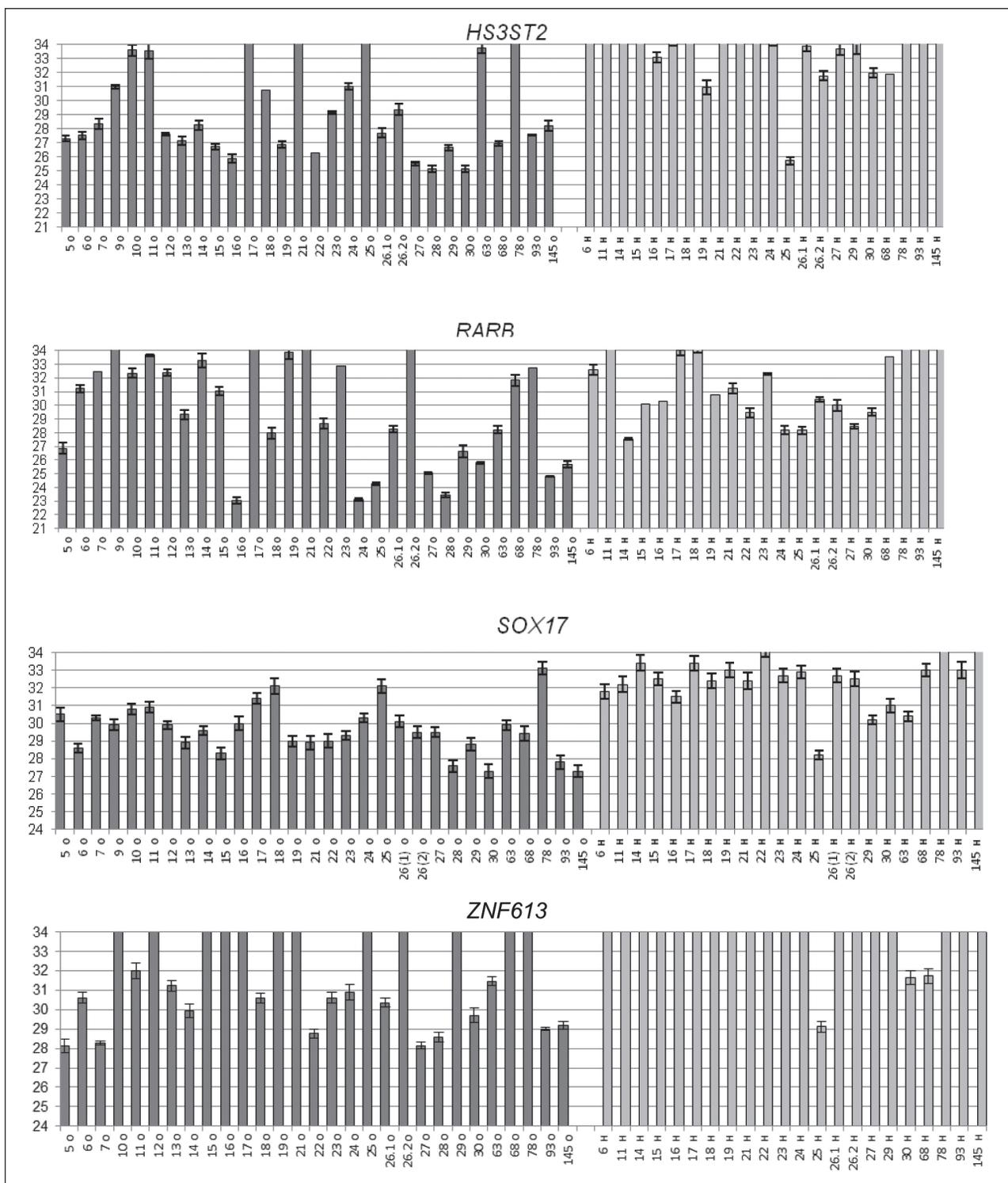


Рис. 2. Результаты GLAD-ПЦР анализа выбранных R(5mC)GY сайтов в препаратах ДНК из образцов тканей больных РМЖ. По оси ординат приведены значения Cq с диапазонами стандартных отклонений. По оси абсцисс указаны номера исследованных образцов тканей (o – опухоль, n – неизменная ткань на линии резекции)

Fig. 2. Results of GLAD-PCR analysis of selected R (5mC) GY sites in DNA preparations from tissue samples from breast cancer patients. The ordinate shows Cq values with standard deviation ranges. The abscissa shows the numbers of the tissue samples examined (o – tumor, n – unchanged tissue on the resection line)

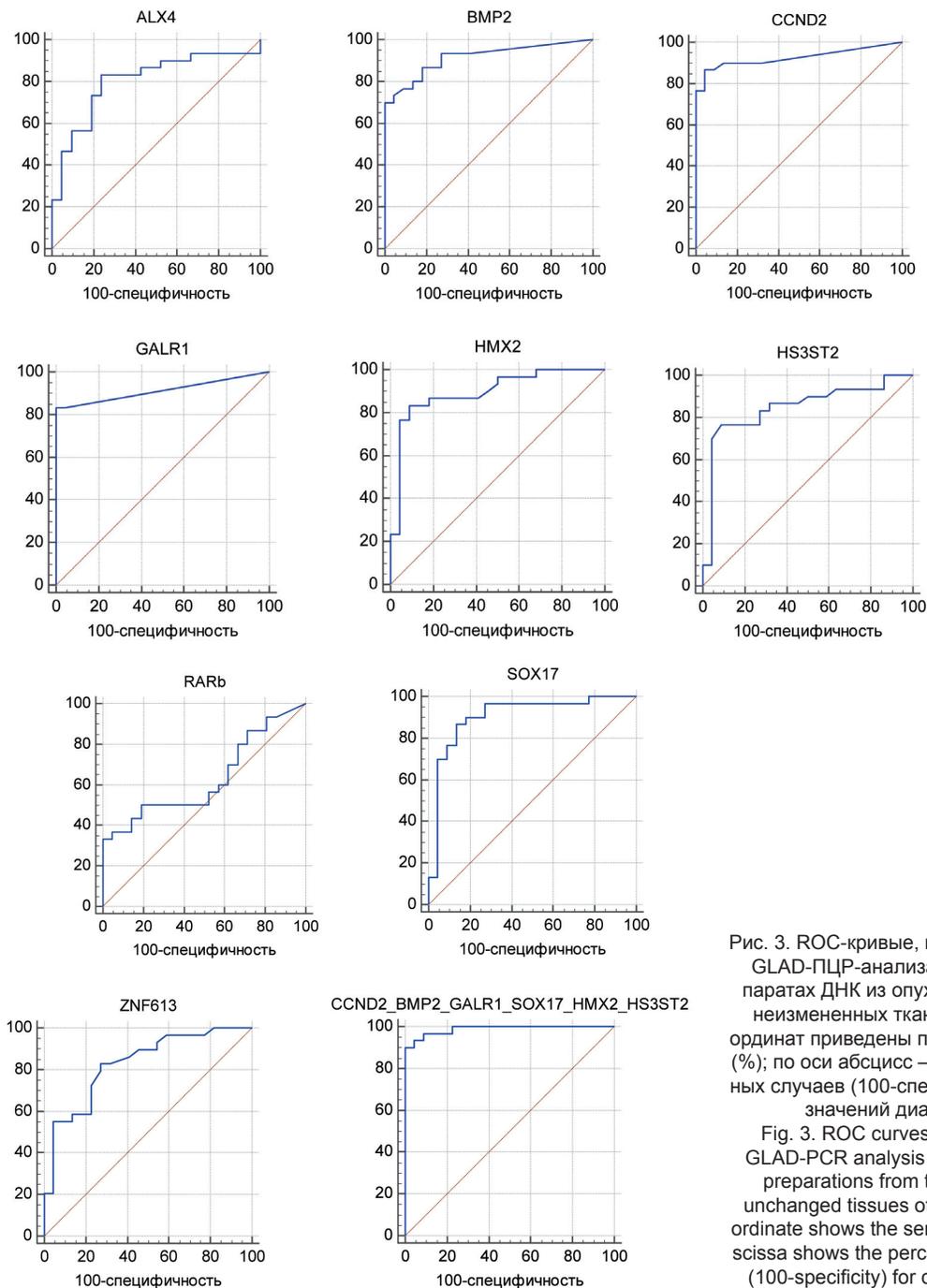


Рис. 3. ROC-кривые, полученные для результатов GLAD-ПЦР-анализа сайтов R(5mC)GY в препаратах ДНК из опухолевых и морфологически неизменных тканей больных РМЖ. По оси ординат приведены показатели чувствительности (%); по оси абсцисс – процент ложноположительных случаев (100-специфичность) для различных значений диагностических тестов

Fig. 3. ROC curves obtained for the results of GLAD-PCR analysis of R (5mC) GY sites in DNA preparations from tumor and morphologically unchanged tissues of breast cancer patients. The ordinate shows the sensitivity indicators (%), the abscissa shows the percentage of false-positive cases (100-specificity) for different values of diagnostic tests

логически неизменных тканей определяются как отрицательные (табл. 3).

При исследовании 48 пар образцов тканей, полученных от больных РМЖ, К. Yari et al. показали, что метилированные формы гена *RARB* обнаруживаются исключительно в опухолевых образцах с частотой 10,4 % [26]. Анализ данных, полученных нами для эпигенетического маркера *RARB*, также выявил низкий уровень диагностической чувствительности (табл. 3).

J. Yang et al. наблюдали инактивацию гена *ALX4* при метилировании промотора во всех трех исследованных клеточных линиях РМЖ и в 69,44 % (75

из 108 образцов) первичных опухолей, тогда как в неизменных тканях молочной железы этот ген не был метилирован [12]. Однако в проведенном нами исследовании сайта R(5mC)GY в гене *ALX4* около трети образцов неизменных тканей были определены как положительные (табл. 3).

Подобные расхождения могут быть обусловлены, в частности, особенностями морфологических характеристик РМЖ в выборках, исследованных разными авторами. Известно, что гистологически РМЖ представляет собой весьма разнородную группу злокачественных новообразований, которые могут различаться по профилю метилирования

Таблица 3/Table 3

Данные ROC-анализа результатов GLAD-ПЦР, полученных при исследовании сайтов R(5mC)GY в образцах ДНК из опухолевых и морфологически неизменных тканей больных РМЖ (в порядке уменьшения значений ППК)

Data of ROC analysis of GLAD-PCR results obtained in the study of R(5mC)GY sites in DNA samples from tumor and morphologically unchanged tissues of breast cancer patients (in order of decreasing AUC values)

Ген/ Gene	Образцы РМЖ, определенные как положительные/общее число образцов РМЖ/ Breast cancer samples defined as positive/total number of breast cancer samples	Чувствительность/ Sensitivity	Образцы морфологически неизменных тканей, определенные как отрицательные/общее число образцов морфологически неизменных тканей/ Samples of morphologically unaltered tissues, defined as negative/total number of samples of morphologically unaltered tissues	Специфичность/ Specificity	ППК (стандартная ошибка) Standard error	95 % доверительный интервал/ 95% confidence interval
CCND2	26/30	86,7 %	21/22	95,5 %	0,926 (0,038)	0,818–0,980
BMP2	21/30	70,0 %	22/22	100 %	0,914 (0,039)	0,803–0,974
GALR1	25/30	83,3 %	22/22	100 %	0,913 (0,036)	0,801–0,973
SOX17	26/30	86,7 %	19/22	86,4 %	0,905 (0,048)	0,791–0,968
HMX2	25/30	83,3 %	20/22	90,9 %	0,894 (0,047)	0,777–0,962
HS3ST2	23/30	76,7 %	20/22	90,9 %	0,845 (0,059)	0,718–0,931
ZNF613	24/29	82,8 %	16/22	72,7 %	0,828 (0,058)	0,697–0,919
ALX4	24/29	82,8 %	16/22	72,7 %	0,762 (0,072)	0,622–0,870
RARB	9/29	31,0 %	21/22	95,5 %	0,599 (0,081)	0,452–0,734
Комбинация генов CCND2, BMP2, GALR1, SOX17, HMX2, HS3ST2	27/30	90,0 %	22/22	100,0 %	0,988 (0,011)	0,909–1,000

ДНК. Помимо основных форм (неинвазивный/инвазивный внутрипротоковый и дольковый рак) описан целый ряд особых вариантов РМЖ: папиллярный, тубулярный, аденокистозный, секреторный, апокриновый, метапластический, болезнь Педжета и др., на общую долю которых приходится до 20–25 % всех случаев заболевания [35]. Кроме того, нельзя исключить зависимости статуса метилирования генов от расово-этнической принадлежности пациенток [36].

Заключение

Полученные результаты показывают, что метод GLAD-ПЦР позволяет определять метилированные сайты R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в образцах ДНК, выделенных из тканей РМЖ. При исследовании клинических образцов показана высокая диагностическая эффективность панели эпигенетических маркеров РМЖ, включающей сайты R(5mC)GY в составе генов *CCND2*, *BMP2*, *GALR1*, *SOX17*, *HMX2* и *HS3ST2*: общие показатели чувствительности и специфичности теста составляют соответственно 90,0 и 100,0 %.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. GLOBOCAN 2020 Database Provides Latest Global Data on Cancer Burden, Cancer Deaths [Internet]. URL: <https://ascopost.com/news/december-2020/globocan-2020-database-provides-latest-global-data-on-cancer-burden-cancer-deaths/> (cited 19.04.2021).
2. Руководство по ранней диагностике рака. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2018. 38 с. [Guide to cancer early diagnosis. Geneva: World Health Organization, 2018. 38 p. (in Russian)].
3. Breast Cancer Survival Rates [Internet]. URL: <https://www.webmd.com/breast-cancer/guide/breast-cancer-survival-rates> (19.04.2021).
4. Hesson L.B., Pritchard A.L. Clinical Epigenetics. Springer Singapore, 2019. P. 153–171. doi: 10.1007/978-981-13-8958-0.
5. Gao L., Emperle M., Guo Y., Grimm S.A., Ren W., Adam S., Uryu H., Zhang Z.M., Chen D., Yin J., Dukatz M., Anteneh H., Jurkowska R.Z.,

- Lu J., Wang Y., Bashtrykov P., Wade P.A., Wang G.G., Jeltsch A., Song J. Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. Nat Commun. 2020 Jul 3; 11(1): 3355. doi: 10.1038/s41467-020-17109-4.
6. Кузнецов В.В., Акишев А.Г., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Способ определения нуклеотидной последовательности Рu(5mC)GPy в заданном положении протяженной ДНК. Патент РФ № 2525710. Заявл. 13.06.2013. Опубл. 20.08.2014. [Kuznetsov V.V., Akishev A.G., Abdurashitov M.A., Degtyarev S.Kh. Method of detecting nucleotide sequence Pu(5mC)GPy at predetermined position of long-distance DNA. The patent of Russian Federation No 2525710. 20.08.2014. (in Russian)].
7. Евдокимов А.А., Нетесова Н.А., Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Давидович Е.С., Кузнецов В.В., Ермолаев Ю.Д., Карпов А.Б., Сазонов А.Э., Тахауов Р.М., Дегтярев С.Х. Применение

метода GLAD-ПЦР анализа для выявления сайтов метилирования в регуляторных областях генов-онкосупрессоров ELMO1 и ESR1 при колоректальном раке. Вопросы онкологии. 2016; 62(1): 117–21. [Evdokimov A.A., Netesova N.A., Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Davidovich E.S., Kuznetsov V.V., Ermolaev Yu.D., Karpov A.B., Azanov A.E., Takhaov R.M., Degtyarev S.Kh. Application of GLAD-PCR analysis for the methylation sites detection in the regulatory areas of tumor-suppressor genes ELMO1 and ESR1 in colorectal cancer. Problems in Oncology. 2016; 62(1): 117–21. (in Russian)].

8. Evdokimov A.A., Netesova N.A., Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G. GLAD-PCR Assay of DNA Methylation Markers Associated with Colorectal Cancer. Biol Med (Aligarh) 8: 342. doi: 10.4172/0974-8369.1000342.

9. Smetannikova N.A., Evdokimov A.A., Netesova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Dubinin E.V., Pozdnyakov P.I., Vihlyanov I.V., Nikitin M.K., Topolnitsky E.B., Karpov A.B., Kolomiets S.A., Degtyarev S.K. Application of GLAD-PCR Assay for Study on DNA Methylation in Regulatory Regions of Some Tumor-Suppressor Genes in Lung Cancer. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2019 Sep 20; 22(9): 551–561. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2019.09.01.

10. Малышев Б.С., Нетесова Н.А., Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Дубинин Е.В., Азанов А.З., Вихлянов И.В., Никитин М.К., Карпов А.Б., Дегтярев С.Х. GLAD-ПЦР-анализ сайтов метилирования ДНК в регуляторных областях генов-онкосупрессоров при раке желудка. Acta Naturae. 2020; 12(3): 124–133. doi: 10.32607/actanaturae.11070. [Malyshev B.S., Netesova N.A., Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Dubinin E.V., Azanov A.Z., Vihlyanov I.V., Nikitin M.K., Karpov A.B., Degtyarev S.Kh. GLAD PCR assay of DNA methylation sites in regulatory regions of some tumor-suppressor genes in breast cancer. Acta Naturae. 2020; 12(3): 124–133. (in Russian)]. doi: 10.32607/actanaturae.11070.

11. Дубинин Е.В., Евдокимов А.А., Нетесова Н.А., Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Давидович Е.С., Дегтярев С.Х., Кузнецов В.В., Михеев В.Н., Карпов А.Б., Малышев Б.С., Федотов В.В. Способ определения метилирования сайтов PuCGPy регуляторных областей генов-онкомаркеров колоректального рака методом GLAD-ПЦР-анализа и набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для осуществления указанного способа. Патент РФ № 2630669. Заявл. 16.07.2015. Оpubl. 10.09.2017. [Dubinin E.V., Evdokimov A.A., Netesova N.A., Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Davidovich E.S., Degtyarev S.Kh., Kuznetsov V.V., Miheev V.N., Karpov A.B., Malyshev B.S., Fedotov V.V. Method of determining the methylation sites PuCGPy regulatory regions of genes-markers of colorectal cancer by GLAD-PCR-analysis and oligonucleotide primers and fluorescent-labelled probes for realizing said method. The patent of Russian Federation No 2630669. 10.09.2017. (in Russian)].

12. Yang J., Han F., Liu W., Chen H., Hao X., Jiang X., Yin L., Huang Y., Cao J., Zhang H., Liu J. ALX4, an epigenetically down regulated tumor suppressor, inhibits breast cancer progression by interfering Wnt/ β -catenin pathway. J Exp Clin Cancer Res. 2017 Nov; 36(1): 170. doi: 10.1186/s13046-017-0643-9.

13. Du M., Su X.M., Zhang T., Xing Y.J. Aberrant promoter DNA methylation inhibits bone morphogenetic protein 2 expression and contributes to drug resistance in breast cancer. Mol Med Rep. 2014 Aug; 10(2): 1051–5. doi: 10.3892/mmr.2014.2276.

14. Li Z., Guo X., Wu Y., Li S., Yan J., Peng L., Xiao Z., Wang S., Deng Z., Dai L., Yi W., Xia K., Tang L., Wang J. Methylation profiling of 48 candidate genes in tumor and matched normal tissues from breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2015 Feb; 149(3): 767–79. doi: 10.1007/s10549-015-3276-8.

15. Yang J., Niu H., Huang Y., Yang K. A Systematic Analysis of the Relationship of CDH13 Promoter Methylation and Breast Cancer Risk and Prognosis. PLoS One. 2016 May 6; 11(5): e0149185. doi: 10.1371/journal.pone.0149185.

16. Liu J., Sun X., Qin S., Wang H., Du N., Li Y., Pang Y., Wang C., Xu C., Ren H. CDH1 promoter methylation correlates with decreased gene expression and poor prognosis in patients with breast cancer. Oncol Lett. 2016 Apr; 11(4): 2635–2643. doi: 10.3892/ol.2016.4274.

17. Jing X., Liang H., Hao C., Hongxia L., Cui X. Analyses of an epigenetic switch involved in the activation of pioneer factor FOXA1 leading to the prognostic value of estrogen receptor and FOXA1 co-expression in breast cancer. Aging (Albany NY). 2019; 11(18): 7442–7456. doi: 10.18632/aging.102250.

18. Lindqvist B.M., Wingren S., Motlagh P.B., Nilsson T.K. Whole genome DNA methylation signature of HER2-positive breast cancer. Epigenetics. 2014 Aug; 9(8): 1149–62. doi: 10.4161/epi.29632.

19. Wang D., Yang P.N., Chen J., Zhou X.Y., Liu Q.J., Li H.J., Li C.L. Promoter hypermethylation may be an important mechanism of the transcriptional inactivation of ARRDC3, GATA5, and ELP3 in invasive ductal breast carcinoma. Mol Cell Biochem. 2014; 396(1–2): 67–77. doi: 10.1007/s11010-014-2143-y.

20. de Groot J.S., Pan X., Meeldijk J., van der Wall E., van Diest P.J., Moelans C.B. Validation of DNA promoter hypermethylation biomarkers in breast cancer—a short report. Cell Oncol (Dordr). 2014 Aug; 37(4): 297–303. doi: 10.1007/s13402-014-0189-1.

21. Cheng G., Sun X., Wang J., Xiao G., Wang X., Fan X., Zu L., Hao M., Qu Q., Mao Y., Xue Y., Wang J. HIC1 silencing in triple-negative breast cancer drives progression through misregulation of LCN2. Cancer Res. 2014 Feb; 74(3): 862–72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2420.

22. Stürzaker C., Zotenko E., Song J.Z., Qu W., Nair S.S., Locke W.J., Stone A., Armstrong N.J., Robinson M.D., Dobrovic A., Avery-Kieja K.A., Peters K.M., French J.D., Stein S., Korbie D.J., Trau M., Forbes J.F., Scott R.J., Brown M.A., Francis G.D., Clark S.J. Methylation sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. Nat Commun. 2015 Feb 2; 6: 5899. doi: 10.1038/ncomms6899.

23. Kassim S.K., Shehata H.H., Abou-Alhussein M.M., Sallam M.M., Amin I.I. Laboratory validation of formal concept analysis of the methylation status of microarray-detected genes in primary breast cancer. Tumour Biol. 2017 Jun; 39(6): 1010428317698390. doi: 10.1177/1010428317698390.

24. Pathiraja T.N., Nayak S.R., Xi Y., Jiang S., Garee J.P., Edwards D.P., Lee A.V., Chen J., Shea M.J., Santen R.J., Gannon F., Kangaspekka S., Jelinek J., Issa J.P., Richer J.K., Elias A., McIlroy M., Young L.S., Davidson N.E., Schiff R., Li W., Oesterreich S. Epigenetic reprogramming of HOXC10 in endocrine-resistant breast cancer. Sci Transl Med. 2014 Mar 26; 6(229): 229ra41. doi: 10.1126/scitranslmed.3008326.

25. Симонова О.А., Кузнецова Е.Б., Поддубская Е.В., Кекеева Т.В., Керимов Р.А., Троценко И.Д., Танас А.С., Руденко В.В., Алексеева Е.А., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Гены ламининов, конститутивно и аномально метилированные при раке молочной железы. Молекулярная биология. 2015; 49(4): 667–677. [Simonova O.A., Kuznetsova E.B., Poddubskaya E.V., Kekeeva T.V., Kerimov R.A., Trotsenko I.D., Tanas A.S., Rudenko V.V., Alekseeva E.A., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. DNA methylation in the promoter regions of the laminin family genes in normal and breast carcinoma tissues. Molecular Biology. 2015; 49(4): 598–607. (in Russian)].

26. Yari K., Rahimi Z. Promoter Methylation Status of the Retinoic Acid Receptor-Beta 2 Gene in Breast Cancer Patients: A Case Control Study and Systematic Review. Breast Care (Basel). 2019; 14(2): 117–123. doi: 10.1159/000489874.

27. Hagrass H.A., Pasha H.F., Shaheen M.A., Abdel Bary E.H., Kassem R. Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients. Mol Biol Rep. 2014; 41(1): 57–65. doi: 10.1007/s11033-013-2837-3.

28. Garattini E., Bolis M., Garattini S.K., Fratelli M., Centritto F., Paroni G., Gianni' M., Zanetti A., Pagani A., Fisher J.N., Zambelli A., Terao M. Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again. Cancer Treat Rev. 2014 Jul; 40(6): 739–49. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.01.001.

29. Wu H.C., Southey M.C., Hibshoosh H., Santella R.M., Terry M.B. DNA Methylation in Breast Tumor from High-risk Women in the Breast Cancer Family Registry. Anticancer Res. 2017; 37(2): 659–664. doi: 10.21873/anticancer.11361.

30. Lin I.H., Chen D.T., Chang Y.F., Lee Y.L., Su C.H., Cheng C., Tsai Y.C., Ng S.C., Chen H.T., Lee M.C., Chen H.W., Suen S.H., Chen Y.C., Liu T.T., Chang C.H., Hsu M.T. Hierarchical clustering of breast cancer methylomes revealed differentially methylated and expressed breast cancer genes. PLoS One. 2015 Feb 23; 10(2): e0118453. doi: 10.1371/journal.pone.0118453.

31. Masood S., El-Gabry E., Zhang C., Wang Z. DNA Methylation of the hTERT Gene in Breast Cancer Revisited: Diagnostic and Clinical Implications. Lab Med. 2016 Nov; 47(4): 293–299. doi: 10.1093/labmed/lmw043.

32. Silva T.C., Coetzee S.G., Gull N., Yao L., Hazelett D.J., Noushmehr H., Lin D.C., Berman B.P. ELMER v.2: an R/Bioconductor package to reconstruct gene regulatory networks from DNA methylation and transcriptome profiles. Bioinformatics. 2019; 35(11): 1974–1977. doi: 10.1093/bioinformatics/bty902.

33. HUGO Gene Nomenclature Committee. The resource for approved human gene nomenclature [Internet]. URL: <http://www.genenames.org> (cited 2021 Apr 19).

34. Логистическая регрессия и ROC-анализ – математический аппарат [Интернет]. URL: <https://loginom.ru/blog/logistic-regression-roc-auc> (дата обращения: 19.04.2021). [Logistic regression and ROC analysis – mathematical apparatus [Internet]. URL: <https://loginom.ru/blog/logistic-regression-roc-auc> (cited 19.04.2021). (in Russian)].

35. «Золотой стандарт» диагностики и лечения рака молочной железы 2021. Российское общество онкоммаммологов. Версия 2.0. 176 с. [Интернет]. URL: http://www.abvpress.ru/project/www.abvpress.ru/KP_POOM_12.10.20.pdf (дата обращения: 19.04.2021). [«Gold Standard» for breast cancer diagnosis and treatment 2021. Russian society of oncomammologists. Version 2.0. 176 p. [Internet]. URL: http://www.abvpress.ru/project/www.abvpress.ru/KP_POOM_12.10.20.pdf (cited 19.04.2021). (in Russian)].

abvpress.ru/project/www.abvpress.ru/KP_POOM_12.10.20.pdf (cited 19.04.2021). (in Russian)].

36. Xia Y.Y., Ding Y.B., Liu X.Q., Chen X.M., Cheng S.Q., Li L.B., Ma M.F., He J.L., Wang Y.X. Racial/ethnic disparities in human DNA

methylation. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1846(1): 258–62. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.07.001.

Поступила/Received 20.04.2021
Принята в печать/Accepted 16.08.2021

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сметанникова Наталья Анатольевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела геномных исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Россия). E-mail: smetannikova@vector.nsc.ru. SPIN-код: 8548-9071. Researcher ID (WOS): A-5864-2014. Author ID (Scopus): 650423744. ORCID: 0000-0002-5082-8071.

Абдурашитов Мурат Абдурашитович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ООО «СибЭнзайм» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 3360-3217. Researcher ID (WOS): A-6433-2014. Author ID (Scopus): 6701811260.

Акишев Александр Григорьевич, старший научный сотрудник, ООО «СибЭнзайм» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5976-0887. Researcher ID (WOS): A-6476-2014. Author ID (Scopus): 6701467349.

Поздняков Павел Иванович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник разработки и производства средств диагностики, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Россия). SPIN-код: 1427-6109. Researcher ID (WOS): A-6604-2014. Author ID (Scopus): 6603478957.

Дубинин Евгений Викторович, кандидат экономических наук, генеральный директор ООО «ЭпиДжин» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 4473-9233. Author ID (Scopus): 57188727732. ORCID: 0000-0003-3384-8406.

Карпов Андрей Борисович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, ФГУП «Северский биофизический научный центр» ФМБА России (г. Северск, Россия); профессор кафедры организации здравоохранения и общественного здоровья, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 4393-5855. Researcher ID (WOS): R-7251-2016. Author ID (Scopus): 5594444960. ORCID: 0000-0002-0119-2740.

Вихлянов Игорь Владиславович, доктор медицинских наук, главный врач КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (г. Барнаул, Россия). Author ID (Scopus): 57211021828.

Никитин Максим Константинович, заведующий отделением, КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (г. Барнаул, Россия).

Солдатова Светлана Михайловна, заведующая отделением, ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр» ФМБА России (г. Северск, Россия).

Нетесова Нина Александровна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией отдела геномных исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово, Россия). SPIN-код: 2615-3101. Researcher ID (WOS): A-6485-2014. ORCID: 0000-0002-9896-5403.

ВКЛАД АВТОРОВ

Сметанникова Наталья Анатольевна: сбор и обработка данных, статистический анализ, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Абдурашитов Мурат Абдурашитович: разработка концепции и планирование научной работы, сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Акишев Александр Григорьевич: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Поздняков Павел Иванович: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Дубинин Евгений Викторович: сбор и обработка данных, статистический анализ, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Карпов Андрей Борисович: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Вихлянов Игорь Владиславович: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Никитин Максим Константинович: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Солдатова Светлана Михайловна: сбор и обработка данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Нетесова Нина Александровна: разработка концепции и планирование научной работы, сбор и обработка данных, статистический анализ, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Работа проводилась при финансовой поддержке фонда Сколково (грант № Г102/16 от 06 декабря 2016 г.).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Natalya A. Smetannikova, PhD, Senior Researcher, Department of Genomic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Russia). E-mail: smetannikova@vector.nsc.ru. Researcher ID (WOS): A-5864-2014. Author ID (Scopus): 650423744. ORCID: 0000-0002-5082-8071.

Murat A. Abdurashitov, PhD, Senior Researcher, SibEnzaim LLC (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-6433-2014. Author ID (Scopus): 6701811260.

Alexander G. Akishev, PhD, SibEnzaim LLC (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-6476-2014. Author ID (Scopus): 6701467349.

Pavel I. Pozdnyakov, PhD, Leading Researcher of Development and Production of Diagnostic Tools, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Russia). Researcher ID (WOS): A-6604-2014. Author ID (Scopus): 6603478957.

Evgeny V. Dubinin, PhD, General Director of EpiGin LLC (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57188727732. ORCID: 0000-0003-3384-8406.

Andrey B. Karpov, MD, DSc, Professor, Deputy Director for Research, Federal State Unitary Enterprise «Seversk Biophysical Scientific Center» FMBA of Russia (Seversk, Russia); Professor of the Department of Healthcare Organization and Public Health, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): R-7251-2016. Author ID (Scopus): 5594444960. ORCID: 0000-0002-0119-2740.

Igor V. Vikhlyanov, MD, DSc, Chief Physician of the Altai Regional Oncological Dispensary (Barnaul, Russia). Author ID (Scopus): 57211021828.

Maksim K. Nikitin, MD, Head of Department, Altai Regional Oncological Dispensary (Barnaul, Russia).

Svetlana M. Soldatova, Head of Department, Siberian Federal Research and Clinical Center, FMBA of Russia (Seversk, Russia).

Nina A. Netesova, DSc, Head of the Laboratory of the Department of Genomic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Russia). Researcher ID (WOS): A-6485-2014. ORCID: 0000-0002-9896-5403.

AUTHOR CONTRIBUTION

Natalya A. Smetannikova: development of methodology, data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Murat A. Abdurashitov: study conception and design, data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Alexander G. Akishev: development of methodology, data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Pavel I. Pozdnyakov: data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Evgeny V. Dubinin: data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Andrey B. Karpov: data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Igor V. Vikhlyanov: data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Maksim K. Nikitin: data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Svetlana M. Soldatova: data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Nina A. Netesova: conception and design, data collection and analysis, writing, review, revision of the manuscript.

Funding

The present study was supported by the Skolkovo fund (grant № G102/16 from 06.12.2016).

Conflicts of interests

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.