

УДК575:599.9

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* И *SSTR5-AS1* КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ И ПРОГРЕССИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 Е. А. Филиппова^{1,*}, С. С. Лукина¹, В. И. Логинов^{1,2}, А. М. Бурдённый¹,
И. В. Пронина¹, Н. А. Аржанухина³, Т. П. Казубская³, Э. А. Брага^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

²Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

*e-mail: p.lenyuxa@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 11.06.2024 г.

Метастазирование в лимфатические узлы относится к наиболее важным факторам плохого прогноза больных РМЖ, пятилетняя выживаемость при метастатическом РМЖ составляет менее 30%. Метилирование ДНК происходит на ранних стадиях онкологических заболеваний, а также играет важную роль в развитии лимфогенных метастазов и может служить диагностическим и прогностическим маркером РМЖ. Биоинформатически отобраны гены днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, предположительно гиперметилованные при РМЖ и связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом и метастазированием. Методом количественной метил-специфичной ПЦР показано статистически значимое повышение уровня метилирования этих генов днРНК в опухолях молочной железы по сравнению с парной нормой. Гиперметилование генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* при РМЖ выявлено впервые. Методом статистического анализа установлены положительные корреляции между уровнями метилирования для пар *GAS5* – *HOTAIR* и *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1*. Результат о ко-метиловании *GAS5* и *HOTAIR* при РМЖ согласуется с биоинформатически предсказанным (с привлечением анализа обогащения по функциональной принадлежности и базы данных psPath) участием этих днРНК в регуляции общих сигнальных путей и биологических процессов. Уровень метилирования генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* ассоциирован с показателями прогрессии РМЖ (стадий опухолевого процесса, размером опухоли, наличием метастазов в лимфатические узлы). Предложена модель оценки риска развития лимфогенных метастазов в зависимости от уровня метилирования гена *HOTAIRM1*. Таким образом, получены данные о днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* и гиперметиловании их генов как факторе развития и прогрессии метастатического РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, метилирование ДНК, длинные некодирующие РНК, лимфо-генные метастазы.

DOI: 10.31857/S0016675824100096 **EDN:** WEVYTV

Рак молочной железы (РМЖ) по-прежнему занимает первое место по заболеваемости раком во всем мире среди женщин [1]. Причем заболеваемость РМЖ растет с каждым годом, что значительно влияет на здоровье и качество жизни женщин [2]. В последние годы хотя и отмечается значительный прогресс в лечении РМЖ, частота рецидивов и метастазов все еще остается на высоком уровне. Метастазы в лимфатические узлы являются одним из наиболее важных факторов снижения выживаемости больных РМЖ – 5-летняя выживаемость метастатическим РМЖ остается менее 30% [3, 4].

Исследование молекулярных механизмов лимфо-генного метастазирования и поиск новых биомаркеров являются крайне актуальной задачей.

Развитие и прогрессирование РМЖ включает и генетические, и эпигенетические изменения [5, 6]. В последние годы эпигенетические события рассматриваются как решающие факторы возникновения и прогрессирования опухолей. В ряде исследований охарактеризован метиломный ландшафт РМЖ на ранних стадиях, однако есть данные, что он изменяется в ходе эволюции рака от ранних до поздних стадий и таким образом, будучи

определенным на ранних стадиях, не является репрезентативным на поздних стадиях. Данные о статусе динамического и обратимого метилирования ДНК могут служить источником потенциальных маркеров и терапевтических мишеней для лечения РМЖ [7].

Длинные некодирующие РНК (днРНК) представляют собой класс транскриптов длиной более 200 оснований и хорошо известны своим ограниченным потенциалом кодирования белков [8]. Предыдущие исследования выявили ряд днРНК, участвующих в многоуровневой регуляции экспрессии генов, включая регуляцию транскрипции за счет метилирования ДНК или нарушения активности факторов транскрипции. Хотя сообщалось, что многие днРНК аберрантно экспрессируются при РМЖ [9] и участвуют в таких процессах, как апоптоз [10], пролиферация [11] и метастазирование [12], функции и механизмы большинства днРНК в лимфогенном метастазировании РМЖ не выяснены и требуют дальнейших исследований.

Цель данной работы – изучение вклада метилирования группы генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, включая их ко-метилирование, в развитие и прогрессию РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы РМЖ были собраны и морфологически охарактеризованы в Отделе патоморфологии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на основании классификации ВОЗ [13]. Диагноз поставлен на основании гистологического заключения. Клинико-морфологические характеристики 108 образцов РМЖ представлены в табл. 1.

В исследование брали образцы РМЖ у больных, которые до операции не получали лучевой, химио- или гормонотерапии. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [14]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. Образцы тканей хранили при –70 °С. Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора TissueRuptor® II (QIAGEN, Хильден, Германия).

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при –20 °С. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм, степень очистки ДНК определяли по спектру при длинах волн от 230 до 320 нм на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo

Fisher Scientific, Уилмингтон, Делавэр, США); качество ДНК определяли электрофорезом в 0.8%-ном агарозном геле с использованием системы горизонтального электрофореза (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) с последующей визуализацией геля с помощью системы документации геля (Bio-Rad, Калифорния, США). Уровень метилирования генов днРНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе [15]. Амплификацию проводили на приборе Система ПЦР-детектирования в реальном времени Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Калифорния) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Москва, Россия) по протоколу производителя. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* и контрольного гена *ACTB1* приведены в табл. 2. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК (#G1471; Промега, Калифорния, США). В качестве положительного контроля 100%-ного метилирования использовали коммерческий препарат ДНК (#SD1131; Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, Делавэр).

Таблица 1. Клинико-патоморфологические параметры больных

Клинико-гистологический параметр		Количество образцов
Стадия опухолевого процесса	Ранние стадии (I + II)	80
	III стадия	28
Размер первичной опухоли	T1	21
	T2	68
	T3	9
	T4	10
Лимфогенное метастазирование	Есть	52
	Нет	56
Экспрессия рецептора эстрогена	Есть	87
	Нет	21
Экспрессия рецептора прогестерона	Есть	83
	Нет	25
Экспрессия рецептора HER2	Есть	65
	Нет	43

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры количественной МС-ПЦР

Ген	Праймеры для МС-ПЦР	T _{отж} , °C	Продукт ПЦР, п.н.
<i>GAS5</i>	MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG	185	60
	MR: CGCCCGACGCCTTATCCC		
	UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG	179	60
	UR: CAACACCTTATCCCCATCTTCTCCA		
<i>HOTAIR</i>	MF: CGGGTTTTTATTTTTTCGTTATTGCG	258	54
	MR: CGACTACTCTCGCCAAATTTCACTACTTC		
	UF: TGGGTTTTTATTTTTTTGTTATTGTGTTATTTTG	258	52
	UR: CAACTACTCTCACCAAATTTCACTACTTCACAC		
<i>HOTAIRM1</i>	MF: TTTAGGCGGCGGTAGTTGTTGC	60	212
	MR: ACCCTCTTCCCTTCTCACCTCTCG		
	UF: GATTTGGAGTGTTGGAGTGAAGAAGA	60	229
	UR: TTACAACCACCCAACAACTCTAACC		
<i>SSTR5-AS1</i>	MF: CGGCGTTAGCGGGTCGAGT	59.4	153
	MR: CGCTCCTTCTAACCCTTCGAC		
	UF: TGTGGGTGGTGTAGTGGGTGAGT	60	168
	UR: ACAAACACCACATCCTTCTAACCCTTC		
<i>ACTB1</i>	F: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	60	132
	R: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA		

Примечание. MF/UF — прямой праймер к метилированному/неметилированному аллелю; MR/UR — обратный праймер к метилированному/неметилированному аллелю. Все олигонуклеотиды подобраны по программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Статистика 22 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США) и в программной среде R. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический U-тест Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные выражали в виде медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Корреляционный анализ выполняли с использованием метода ранговой корреляции Спирмена и рассчитывали уровень его значимости. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Дискриминантный анализ был проведен для установления зависимости между вероятностью развития метастазов в лимфатических узлах и индексом метилирования генов днРНК. Константа дискриминации, разделяющая исследованные образцы РМЖ на группы, определялась как значение

функции, равноудаленное от центроидов. Значимость различий при сравнении средних значений дискриминантной функции устанавливали с помощью коэффициента λ Уилкса ($p < 0.001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гиперметилирование генов днРНК GAS5, HOTAIR, HOTAIRM1, SSTR5-AS1 при РМЖ и их вовлеченность в общие биологические процессы

Для отбора генов днРНК, aberrантно метилированных при РМЖ, нами проанализирована база данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>), которая содержит в себе информацию о 724 метилированных генах биомаркеров из опубликованных статей в PubMed, а также данных полногеномного секвенирования метилирования ДНК (WGBS). Дополнительно для уточнения набора днРНК для дальнейшего собственного

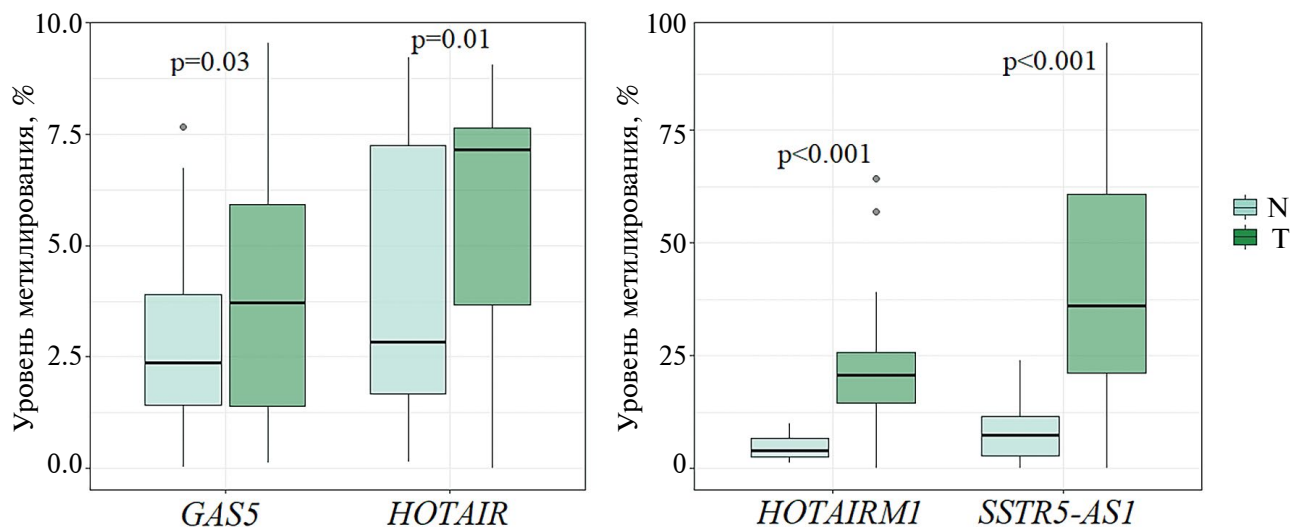


Рис. 1. Уровень метилирования генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* в опухолевых образцах молочной железы и в парной норме. Т – tumor/опухоль; N – norm / прилегающая гистологически нормальная ткань молочной железы.

экспериментального исследования провели анализ базы данных GeneCards по ключевому слову “EMT” (epithelial-mesenchymal transition), поскольку известно, что эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является ключевым процессом прогрессии и метастазирования рака – основной причины смерти больных РМЖ. В результате нами были отобраны четыре гена днРНК – *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* для анализа уровня метилирования в образцах опухолей молочной железы. Нами показано значимое увеличение уровня метилирования ($p < 0.05$; критерий Манна–Уитни) в образцах опухоли по сравнению с нормальной прилегающей тканью молочной железы для всех четырех генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* (рис. 1). Метилирование генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* при РМЖ показано нами впервые.

Подверженность гиперметилированию ряда генов днРНК при РМЖ и ко-метилирование могут указывать на их общее участие в биологических процессах при РМЖ. Нами проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности с привлечением базы данных ncPath (<http://nc-path.pianlab.cn/#/Home>) для четырех исследуемых днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, по результатам которого установили, что днРНК *GAS5*, *HOTAIR* и *HOTAIRM1* вовлечены в регуляцию mTOR – (hsa04150), MAPK – (hsa04010), FoxO – (hsa04068) и Hippo – (hsa04390) сигнальных путей и имеют множество общих мишеней в каждом из путей. Например, общей мишенью для днРНК *GAS5* и *HOTAIR* в mTOR сигнальном пути могут выступать такие гены, как *PTEN*, *PI3K*, *SOS*, *PKC*, *RSK* и др.

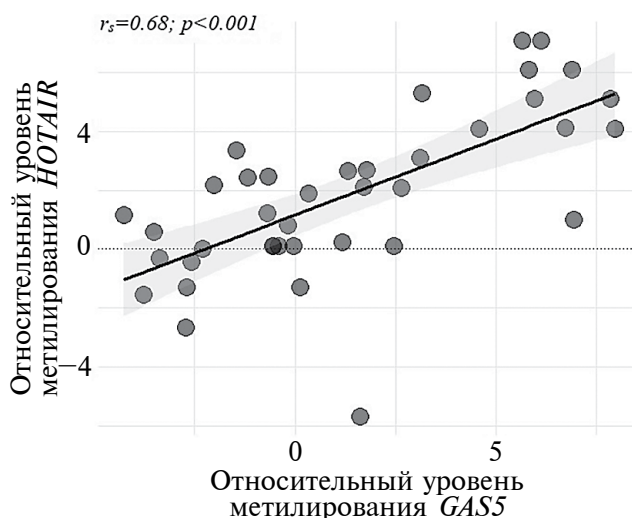


Рис. 2. Корреляция относительного уровня метилирования генов днРНК *HOTAIR* и *GAS5*.

Методом статистического анализа с применением коэффициента корреляции Спирмена с поправкой на множественные сравнения Беньямини–Хохберга установили высокую статистически значимую положительную корреляцию для пары *GAS5* – *HOTAIR* ($r_s = 0.68$; $p < 0.001$) (рис. 2), а также умеренную положительную корреляцию для пары *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1* ($r_s = 0.42$; $p = 0.04$). Таким образом, полученные данные по ко-метилированию генов днРНК, как и биоинформатические предсказания, свидетельствуют об их взаимном участии в общих сигнальных путях и биологических процессах.

*Связь гиперметилирования генов днРНК
HOTAIRM1 и SSTR5-AS1 с прогрессией РМЖ.
Метилирование HOTAIRM1 как фактор
прогноза лимфогенных метастазов*

При сравнении уровня метилирования четырех генов днРНК на более поздней стадии (III) по сравнению с таковым на ранних стадиях (I–II) нами показано значимое ($p < 0.05$) увеличение уровня метилирования на поздней стадии для генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* (рис. 3, а). Также уровень метилирования генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* был значимо ($p < 0.05$) выше в образцах опухолей молочной железы пациенток с размером опухоли T3–T4 по сравнению с T1–T2 (см. рис. 3, б). При оценке уровня метилирования генов днРНК в образцах опухолей молочной железы в зависимости от наличия метастазов нами установлено высокозначимое ($p < 0.005$) повышение уровня метилирования для генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* в образцах с наличием метастазов в лимфатических узлах (N1–N3) (см. рис. 3, в).

Таким образом, нами определены два гена днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1*, уровень метилирования которых статистически значимо коррелирует с такими показателями прогрессии РМЖ, как стадия, размер опухоли, наличие метастазов в лимфатических узлах. При сопоставлении уровня метилирования с иммуногистохимическими показателями образцов от больных РМЖ, такими как экспрессия рецепторов PR, ER и HER2, нами установлено значимое снижение уровня метилирования для гена днРНК *GAS5* в опухолевых образцах от пациенток с РМЖ, экспрессирующих рецептор PR, по сравнению с опухолевыми образцами от пациенток с РМЖ, не экспрессирующими рецептор PR ($p = 0.04$).

Для установления зависимости между развитием лимфогенных метастазов и уровнем метилирования генов днРНК нами проведен дискриминантный анализ, в результате которого была получена следующая модель:

$$Y_{lm} = -1.817 + 0.087 * X_{mi} (\text{HOTAIRM1}),$$

где Y_{lm} – дискриминантная функция, характеризующая вероятность наличия лимфогенного метастазирования, X_{mi} (*HOTAIRM1*) – индекс метилирования днРНК *HOTAIRM1* (%).

Константа дискриминации, разделяющая исследуемых на две группы, определялась как значение функции, равноудаленное от центроидов, которые составили в группе с отсутствием лимфогенного метастазирования -0.33 , а при наличии лимфогенного метастазирования 0.456 . Соответственно, константа дискриминации равна 0.063 . При сравнении средних значений дискриминантной функции в обеих группах с помощью коэффициента λ Уилкса были установлены статистически значимые различия ($p = 0.008$). Индекс метилирования (mi) днРНК *HOTAIRM1* характеризовался прямой связью с вероятностью лимфогенного метастазирования: при увеличении mi днРНК *HOTAIRM1* вероятность лимфогенного метастазирования возрастала. Принадлежность пациентов к группе высокого или низкого риска лимфогенного метастазирования определялась исходя из рассчитанных значений прогностической дискриминантной функции: при значении функции более 0.063 – к группе высокого риска лимфогенного метастазирования, при значении функции менее 0.063 – относился к группе низкого риска. Чувствительность модели составила 71.4% , специфичность – 72.4% . К сожалению, представленная модель не была валидирована на

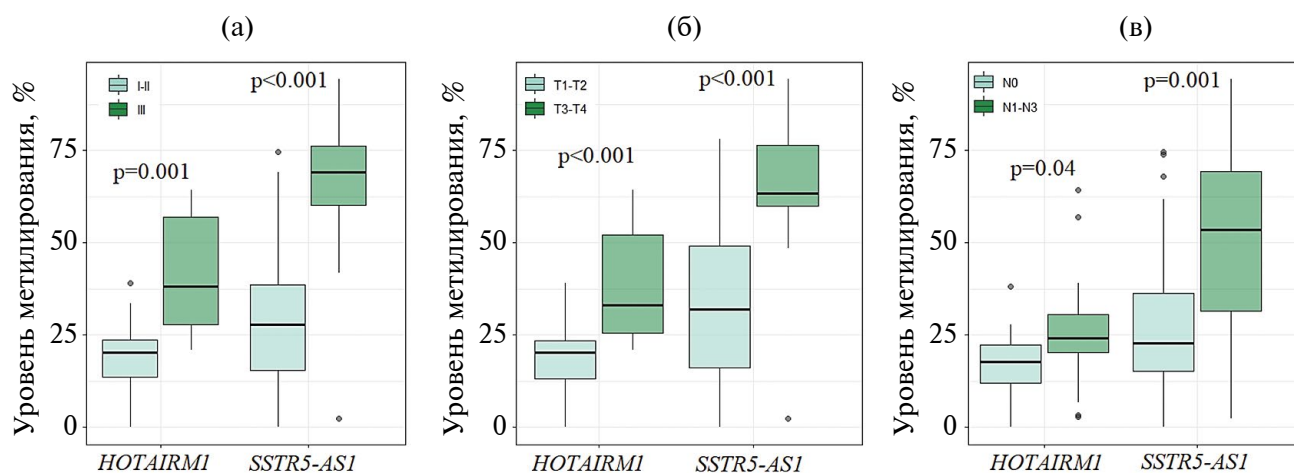


Рис. 3. Связь уровня метилирования генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* со стадией онкологического процесса (а), с размером опухоли (б) и лимфогенным метастазированием (в). См. текст. NO – образцы без метастазов в лимфатических узлах.

дополнительной выборке образцов на момент подготовки публикации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее показано, что метилирование ДНК является маркером злокачественных опухолей [16] и происходит на ранних стадиях развития РМЖ [17], а также играет важную роль в регуляции развития метастазов в лимфатических узлах. Имелось также сообщение, что метилирование межгенных областей может иметь биологическое значение в регуляции экспрессии *HOTAIR* [18]. В настоящей работе исследовано метилирование четырех генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SSTR5-AS1*, *HOTAIRM1*; гиперметилирование генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* обнаружено при РМЖ впервые. Ранее нами сообщалось о гиперметилировании гена *GAS5* [19] на небольшой выборке образцов РМЖ, однако в текущем исследовании нам удалось подтвердить полученные ранее данные на более представительной выборке образцов РМЖ.

Полученные данные по ко-метилированию в парах генов *GAS5* – *HOTAIR* и *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1* согласуются с данными биоинформатического анализа о совместном участии исследуемых днРНК в общих сигнальных путях и биологических процессах. Кроме того, данными литературы также подтверждается участие исследуемых нами днРНК в перечисленных выше сигнальных путях. Например, днРНК *GAS5* может действовать как супрессор при раке гортани, поскольку она подавляет пролиферацию клеток и метастазирование, регулируя сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [20]. В работе [21] отмечается, что днРНК *HOTAIR* играет роль в прогрессировании РМЖ, возможно, за счет активации сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. днРНК *HOTAIRM1* способствует пролиферации клеток остеосаркомы и подавляет апоптоз за счет усиления эффекта Варбурга через ось miR-664b-3p/Rheb/mTOR [22]. Таким образом, наше предположение о совместном участии исследуемых днРНК в общих биологических процессах и сигнальных путях подтверждается как данными биоинформатического анализа, так и данными литературы.

Таким образом, нами определены гены днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, aberrантно метилированные при РМЖ, а также установлена положительная корреляция между уровнями метилирования для пар генов днРНК *GAS5* – *HOTAIR* и *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1*. Для днРНК *GAS5* – *HOTAIR*, чьи гены проявляют синергизм в изменениях уровней метилирования, биоинформатически предсказано участие в регуляции общих сигнальных путей и биологических процессов, что находит подтверждение в данных литературы. Для генов днРНК *HOTAIRM1*

и *SSTR5-AS1* установлена связь уровня метилирования с показателями прогрессии РМЖ (стадией опухолевого процесса, размером опухоли, наличием метастазов в лимфатические узлы); предложена математическая модель для оценки риска развития лимфогенных метастазов в зависимости от уровня метилирования гена *HOTAIRM1*.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 22-75-00132).

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (18.04.2023, № 8-23-2).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J. Clin. 2024. doi: 10.3322/caac.21834
2. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E. et al. Cancer statistics, 2022 // CA Cancer J. Clin. 2022. V. 72. № 1. P. 7–33. doi: 10.3322/caac.21708
3. To B., Isaac D., Andrechek E.R. Studying lymphatic metastasis in breast cancer: Current models, strategies, and clinical perspectives // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2020. V. 25. № 3. P.191–203. doi: 10.1007/s10911-020-09460-5
4. Kim M.Y. Breast cancer metastasis // Adv. Exp. Med. Biol. 2021. V. 1187. P. 183–204. doi: 10.1007/978-981-32-9620-6_9
5. Shukla S., Penta D., Mondal P. et al. Epigenetics of breast cancer: Clinical status of epi-drugs and phytochemicals // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1152. P. 293–310. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_16
6. Rahman M.M., Brane A.C., Tollefsbol T.O. MicroRNAs and epigenetics strategies to reverse breast cancer // Cells. 2019. V. 8. № 10. doi: 10.3390/cells8101214
7. Cervena K., Siskova A., Buchler T. et al. Methylation-based therapies for colorectal cancer // Cells. 2020. V. 9. № 6. doi: 10.3390/cells9061540

8. *Yan H., Bu P.* Non-coding RNA in cancer // *Essays Biochem.* 2021. V. 65. № 4. P. 625–639. doi: 10.1042/EBC20200032
9. *Ahmadpour S.T., Orre C., Bertevello P.S. et al.* Breast cancer chemoresistance: Insights into the regulatory role of lncRNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 21. ID. 15897. doi: 10.3390/ijms242115897
10. *Yang F., Lv S.* LncRNA EPB41L4A-AS1 regulates cell proliferation, apoptosis and metastasis in breast cancer // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2022. V. 52. № 1. P. 3–11. Erratum in: *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2022. V. 52. № 3. ID. 510.
11. *Hashemi M., Moosavi M.S., Abed H.M. et al.* Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy // *Pharmacol. Res.* 2022. V. 184. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106418
12. *Kim J., Piao H.L., Kim B.J. et al.* Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 12. P. 1705–1715. doi: 10.1038/s41588-018-0252-3
13. *Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Chichester C.W.* TNM Classification of Malignant Tumours. 8th. ed. / Eds 2017. 272 p.
14. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects // *JAMA.* 2013. V. 310. № 20. P. 2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053
15. *Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A. et al.* Aberrant methylation of 20 miRNA genes specifically involved in various steps of ovarian carcinoma spread: From primary tumors to peritoneal macroscopic metastases // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 3. doi: 10.3390/ijms23031300
16. *Wu J., Xiao Y., Xia C. et al.* Identification of biomarkers for predicting lymph node metastasis of stomach cancer using clinical DNA methylation data // *Dis. Markers.* 2017. V. 2017. doi: 10.1155/2017/5745724
17. *Teschendorff A.E., Gao Y., Jones A. et al.* DNA methylation outliers in normal breast tissue identify field defects that are enriched in cancer // *Nat. Commun.* 2016. V. 29. № 7. doi: 10.1038/ncomms10478
18. *Lu L., Zhu G., Zhang C. et al.* Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 136. № 3. P. 875–83. doi: 10.1007/s10549-012-2314-z
19. *Selezneva A.D., Filippova E.A., Selezneva A.D. et al.* Hypermethylation of long non-coding RNA genes group in the breast cancer development and progression // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022. V. 173. № 6. P. 765–769. doi: 10.1007/s10517-022-05627-8
20. *Liu W., Zhan J., Zhong R. et al.* Upregulation of long noncoding RNA GAS5 suppresses cell proliferation and metastasis in laryngeal cancer via regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2021. V. 20. doi: 10.1177/1533033821990074
21. *Sadeghalvad M., Mansouri K., Mohammadi-Motlagh H.R. et al.* Long non-coding RNA HOTAIR induces the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer cells // *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2022. V. 68. № 4. P. 456–462. doi: 10.1590/1806-9282.20210966
22. *Yu X., Duan W., Wu F. et al.* LncRNA-HOTAIRM1 promotes aerobic glycolysis and proliferation in osteosarcoma via the miR-664b-3p/Rheb/mTOR pathway // *Cancer Sci.* 2023. V. 114. № 9. P. 3537–3552. doi: 10.1111/cas.15881

Hypermethylation of Long Non-Coding RNA Genes *GAS5*, *Hota**ir*, *Hota**irm1* and *SSTR5-AS1* As Factors in the Development and Progression of Metastatic Breast Cancer

E. A. Filippova^{1, *}, S. S. Lukina¹, V. I. Loginov^{1, 2}, A. M. Burdenny¹,
I. V. Pronina¹, N. A. Arzhanukhina³, T. P. Kazubskaya³, E. A. Braga^{1, 2}

¹*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

²*Medical Genetic Research Center, Moscow, 115522 Russia*

³*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, the Ministry of Health of Russia, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail: p.lenyxa@yandex.ru*

Metastasis to the lymph nodes is one of the most important factors in the poor prognosis of patients with breast cancer; the five-year survival rate for metastatic breast cancer is less than 30%. DNA methylation occurs in the early stages of the development of cancer, and also plays an important role in the development of lymphatic metastases and can serve as a diagnostic and prognostic marker of malignant tumors, including breast cancer. The lncRNA genes *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, presumably hypermethylated in breast cancer and associated with epithelial-mesenchymal transition and metastasis, were bioinformatically selected. Quantitative methyl-specific PCR showed a statistically significant increase in the methylation level of these lncRNA genes in breast tumors compared to the paired norm. Hypermethylation of the *HOTAIRM1* and *SSTR5-AS1* genes in breast cancer was identified for the first time. Using statistical analysis, positive correlations were established between methylation levels for the *GAS5-HOTAIR* and *SSTR5-AS1-HOTAIRM1* pairs. The result of co-methylation of *GAS5* and *HOTAIR* in breast cancer is consistent with the bioinformatically predicted (using enrichment analysis and the ncPath database) participation of these lncRNAs in the regulation of common signaling pathways and biological processes. The level of methylation of the lncRNA genes *HOTAIRM1* and *SSTR5-AS1* is associated with indicators of breast cancer progression (stage of the tumor process, tumor size, presence of metastases in the lymph nodes). A model has been proposed for assessing the risk of developing lymphogenous metastases depending on the level of methylation of the *HOTAIRM1* gene. Thus, data were obtained on lncRNAs *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* and *SSTR5-AS1* and hypermethylation of their genes as factors in the development and progression of metastatic breast cancer.

Keywords: breast cancer, DNA methylation, long non-coding RNA, lymphogenous metastases.