

ГРУППА НОВЫХ ГИПЕРМЕТИЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ И ПРОГРЕССИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. Е. А. Филиппова^{а, *}, В. И. Логинов^а, С. С. Лукина^а, А. М. Бурдённый^а,
И. В. Пронина^а, Т. П. Казубская^б, Э. А. Брага^а

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

^б Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения России, Москва, 115478 Россия

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

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 30.08.2023 г.

Рак молочной железы (РМЖ) — самый распространенный вид рака у женщин, поэтому крайне актуальным остается изучение механизмов метастазирования, основной причины смерти при этом заболевании, а также поиск новых маркеров ранней диагностики и прогноза РМЖ. Выявление механизмов регуляции генов с участием некодирующих РНК, в частности длинных некодирующих РНК (днРНК), открывает новые перспективы в диагностике и терапии РМЖ. В настоящей работе уровень метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) проанализирован методом количественной метилспецифичной ПЦР на выборке из 79 парных (опухоль/норма) образцов РМЖ. Выявлено гиперметилирование всех семи генов днРНК, причем гиперметилирование *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* обнаружено нами при РМЖ впервые. Установлено, что уровень метилирования исследованных генов днРНК статистически значимо коррелировал со стадией опухолевого процесса, размером опухоли, а также с наличием метастазов в лимфатических узлах. Таким образом, метилирование семи исследованных генов днРНК ассоциировано с процессами развития и прогрессии РМЖ, и эти гены можно рассматривать как потенциальные диагностические и прогностические маркеры РМЖ.

Ключевые слова: гены длинных некодирующих РНК, метилирование ДНК, рак молочной железы
DOI: 10.31857/S0026898424010085, **EDN:** ODZLJB

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным общемировой статистики за 2020 год, рак молочной железы (РМЖ) вышел на первое место по заболеваемости эпителиальными опухолями, опережая рак легкого, и представляет главную причину смертности от онкопатологии среди женщин во всем мире [1]. Молекулярные различия между гистологически сходными опухолями затрудняют возможность прогноза клинического исхода при РМЖ [2], а также препятствуют созданию лучшей молекулярной классификации и проведению персонализированной терапии. Метастазы и рецидивы являются основными причинами смерти от РМЖ [3], причем смертность от отдаленных метастазов значительно выше, чем от лимфогенного метастазирования [4].

Важную роль в патогенезе и прогрессировании РМЖ играют как генетические, так и эпи-

генетические факторы [5]. Эпигенетическая регуляция включает модификацию ДНК посредством метилирования, ковалентные модификации гистонов и ремоделирование хроматина, а также регуляцию генов с участием некодирующих РНК, открытых в последние 20 лет [6]. Тонкая эпигенетическая регуляция очень важна для стабильности генома и более динамичной его реализации, в то время как нарушение регуляции эпигенетических механизмов может приводить к возникновению опухолей, в частности РМЖ [7, 8]. Так, установлено участие микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК) в дерегуляции генов-мишеней при РМЖ и в опухолях других локализаций [9, 10].

ДнРНК — это длинные некодирующие РНК, состоящие более чем из 200 нуклеотидов, которые транскрибируются РНК-полимеразой II и распределяются в цитоплазме и ядре, вы-

полная разнообразная биологическая функция [11]. днРНК вовлечены в развитие и прогрессирование различных видов рака, участвуя в регуляции генов на разных уровнях, включая эпигенетический, транскрипционный и посттранскрипционный, они признаны новыми биомаркерами рака [12, 13]. В последние годы актуальными стали также вопросы эпигенетической регуляции самих регуляторных днРНК, в частности метилирования промоторов генов днРНК. Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация, в которой ДНК-метилтрансфераза (DNMT) катализирует присоединение метильной группы к атому углерода в остатке цитозина в CpG-островках, которые присутствуют примерно в 70% промоторов генов человека, что препятствует прямому связыванию факторов транскрипции и сборке РНК-полимеразы II на промоторах. Аберрантное метилирование ДНК прямо или косвенно изменяет транскрипцию генов-супрессоров опухолевого роста и других факторов канцерогенеза, тем самым ускоряя развитие РМЖ [14, 15]. Снижение уровня метилирования ДНК, усиливающее экспрессию онкогенных днРНК, и специфичное повышение уровня метилирования генов супрессорных днРНК, подавляющее их экспрессию, вовлечены в инициацию злокачественной трансформации. Все большее число исследований показывает, что нарушение регуляции днРНК тесно связано с нарушением апоптоза, опухолевым ростом, метастазированием и резистентностью РМЖ к химиотерапии [16, 17]. Таким образом, актуальным представляется изучение вовлеченности днРНК в патогенез РМЖ и механизмы метастазирования, поиск на их основе новых терапевтических мишеней. Крайне важен также поиск неинвазивных биомаркеров, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью, которые можно использовать для выявления РМЖ на ранней стадии и мониторинга ответа на терапию.

Цель данной работы состояла в определении изменений уровня метилирования группы генов днРНК в опухолях больных РМЖ и в оценке возможной связи этих изменений с развитием и прогрессией РМЖ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы РМЖ собраны и клинически и морфологически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на основании классификации ВОЗ [18]. Клинико-патоморфологические характеристики 79 образцов РМЖ представлены в табл. 1.

В исследовании использовали образцы РМЖ, полученные от больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [19]. 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°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора T10 basic ULTRA-TURRAX (“IKA”, Китай).

Высокомолекулярную ДНК выделяли из тканей по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. ДНК хранили при -20°C . Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (“Thermo Scientific”, США). Концентрация составила от 250 до 550 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2.10–2.35$; $A_{260}/A_{230} = 2.15–2.40$. Целостность ДНК оценивали с использовани-

Таблица 1. Клинико-патоморфологические параметры образцов РМЖ

Клинико-патоморфологический параметр		Количество образцов
Стадия опухолевого процесса	Ранние стадии (I + II)	53
	III стадия	25
Размер первичной опухоли	T1	18
	T2	46
	T3	7
	T4	7
	Есть	42
Лимфогенное метастазирование	Нет	36

ем электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда с известной концентрацией.

Уровень метилирования генов днРНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специ-

фичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ), как описано в работе [20]. Амплификацию проводили на системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом с использованием набора qPCRMix-HS SYBR по протоколу компании “Евроген” (Россия).

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

Ген днРНК	Последовательности олигонуклеотидов ^а , 5'→3'	<i>T</i> _{отж} , °C	Размер ампликона, п.н.
<i>MEG3</i>	MF: CGTTAAGTTCGTATTTTTCGATGGATGTT	60	185
	MR: CGCGAATACTTTTCCCTACGTAAACC		
	UF: TGATGGATGTTTTGAAATTGTTAGGTGTG	60	165
	UR: CAAATACTTTTCCCTACATAAACCCAACTCA		
<i>SEMA3B-AS1</i>	MF: CCACTCCCGCCTAACTACCG	54	91
	MR: ATCGTTCGTCGTGTCGTAAAGT		
	UF: ACTCCACCTAACTACCA	46	90
	UR: TATTGTTTGTGTGTTGTAA		
<i>HAND2-AS1</i>	MF: CGAGGTTGGTACGCGGAG	60	121
	MR: CCGACACAATAAACCGACTC		
	UF: TGGGGTTTTTGTGAGGTTGGTATGT	60	134
	UR: CCCCACACAATAAACCAACTCCTC		
<i>KCNK15-AS1</i>	MF: CGGTGATGGCGAAGTAGAAGGAGT	60	182
	MR: CGAATCCGAAACGAAAAACGACC		
	UF: GATGATGGTGATGGTGAAGTAGAAGGAGT	60	163
	UR: CCAACAATACTAATCCAAAAACAAAACACTC		
<i>ZNF667-AS1</i>	MF: AGGCGCGAGTTTATCGTTTAC	60	254
	MR: ACGCGCGATCCCGAAAT		
	UF: AGGTGTGAGTTTATTGTTTATGTA	58	260
	UR: AACACACAATCCCAAAATCCC		
<i>MAGI2-AS3</i>	MF: CGGAGCGAGTAGTAGTCGAGTTGGT	60	276
	MR: CGACGAAACCCTCCGTA ACTCC		
	UF: TGGAGTGAGTAGTAGTTGAGTTGGTGAGTG	59.4	330
	UR: CTCTCTCTCTACCTTCACTACCAAATCAA ACTAC		
<i>PLUT</i>	MF: CGGGGATTTGGTATTGTGTGGC	60	201
	MR: CТАААССТААССТСТТААТАСГАССАССА		
	UF: TGTTGGAATGTGTATGGGTTTTTGТААAGTT	61	339
	UR: САСААТАССТАААССТААССТСТТААТАСАССА		

^а MF/UF – прямые праймеры к метилированному/неметилированному аллелю, MR/UR – обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю.

Все олигонуклеотиды подобраны по программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании “DNASTAR”. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* приведены в табл. 2. Для контрольного локуса *ACTB1* использованы олигонуклеотиды из работы [21]. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК (#G1471; “Promega”, США). В качестве положительного контроля 100% метилирования использовали коммерческий препарат ДНК (#SD1131; “Thermo Fisher Scientific”, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22 и в программной среде R. Значимость различий между исследуемыми группами оценивали с использованием

непараметрического U-теста Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ уровней метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) проведен нами на выборке из 79 парных образцов РМЖ. Обнаружено статистически значимое ($p < 0.001$) увеличение уровня метилирования всех семи генов в опухолевой ткани молочной железы по сравнению с нормальной (рис. 1). Гиперметилирование четырех генов (*HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) при РМЖ показано нами впервые. Эти данные указывают на вовлеченность метилирования семи генов днРНК в патогенез РМЖ.

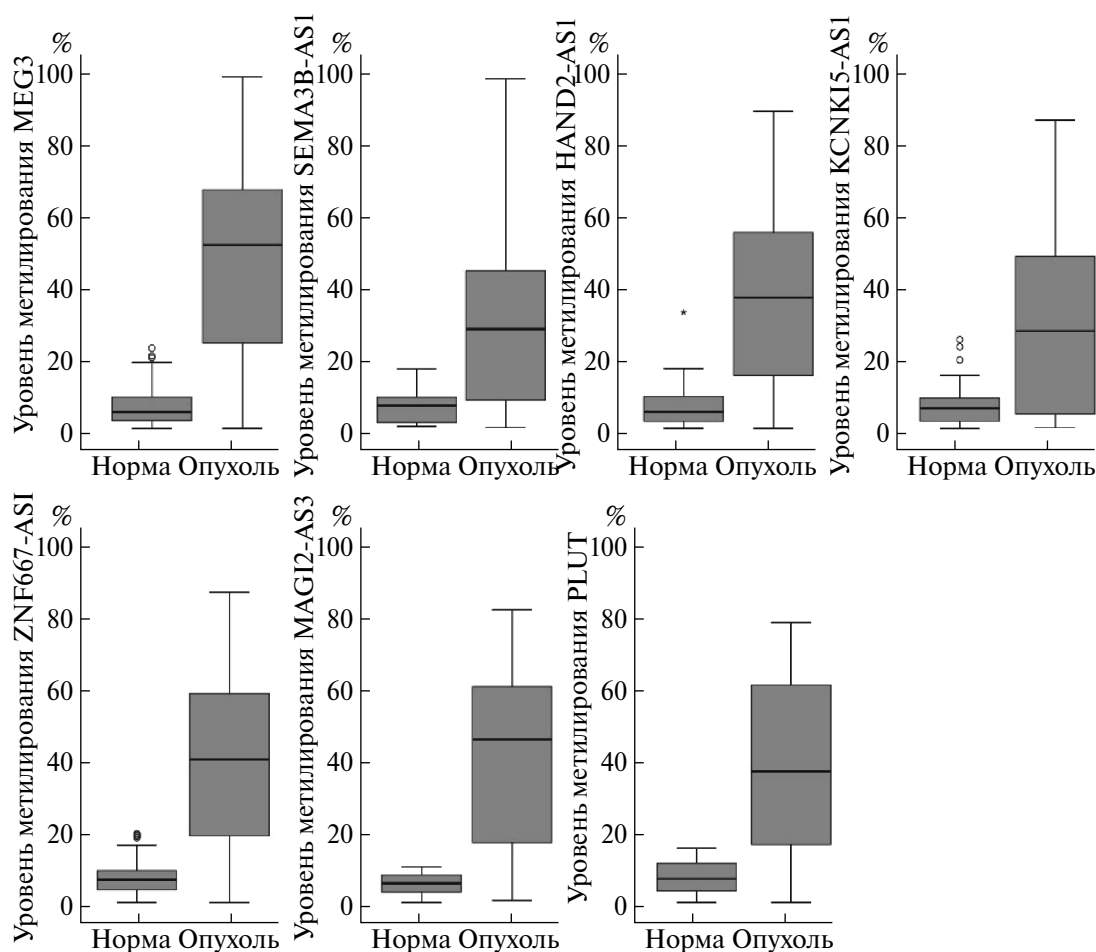


Рис. 1. Уровень метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* в образцах опухолей молочной железы и парных к ним нормальных тканях. Верхняя и нижняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют Q1 и Q3 (внутри прямоугольника попадает 50% значений). Линия внутри прямоугольника соответствует медиане. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечена “ограда”, расположенная на расстоянии 1.5 межквартильных расстояний (Q1–Q3) от нижней и верхней границы “коробки”.

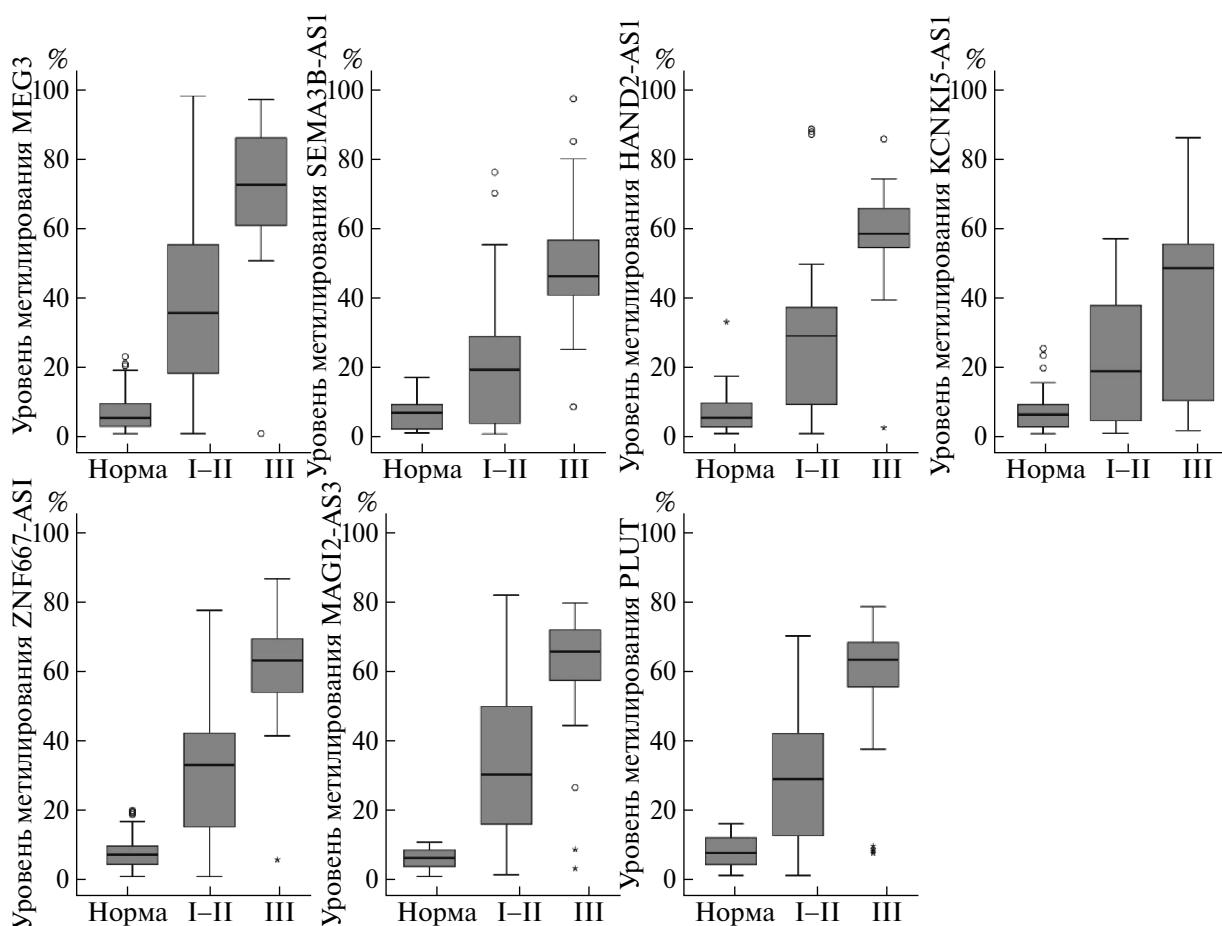


Рис. 2. Уровень метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* в образцах опухолей молочной железы на поздней стадии РМЖ (III) по сравнению с ранними стадиями РМЖ (I–II) и нормальными тканями.

Данные по метилированию генов днРНК при РМЖ были сопоставлены с клинично-патоморфологическими характеристиками образцов больных РМЖ. Выявлено статистически значимое ($p < 0.001$) увеличение уровня метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) (рис. 2) на более поздней стадии РМЖ (III) по сравнению с ранними стадиями (I–II), а также при увеличении размера опухоли ($p < 0.01$).

Для оценки вовлеченности генов днРНК в инициацию развития РМЖ нами были сопоставлены две группы образцов: 53 образца РМЖ с ранними стадиями (I–II) и 79 образцов гистологически неизменной ткани молочной железы. Показано значимое ($p < 0.005$) увеличение уровня метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) в образцах с I–II стадией онкологического процесса по сравнению с нормальной тканью молочной железы (рис. 2).

При сравнении уровня метилирования в образцах РМЖ без метастазов (N_0) и в образцах с метастазами в лимфатических узлах (N_1 – N_3) нами также выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования всех семи генов днРНК: *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* (рис. 3).

При сопоставлении уровня метилирования генов днРНК со степенью дифференцировки опухолевых клеток выявлено статистически значимое ($p = 0.03$) снижение уровня метилирования гена днРНК *SEMA3B-AS1* при увеличении уровня дифференцировки клеток РМЖ.

Проведен анализ изменения уровня метилирования генов днРНК в зависимости от иммуногистохимического статуса опухоли (экспрессия ER, PR, Her2/neu, Ki67).

Выявлено статистически значимое ($p = 0.04$) увеличение уровня метилирования гена днРНК *PLUT* в опухолях молочной железы, экспрессирующих рецепторы прогестерона и эстрогена (PR^+ , ER^+) (рис. 4).

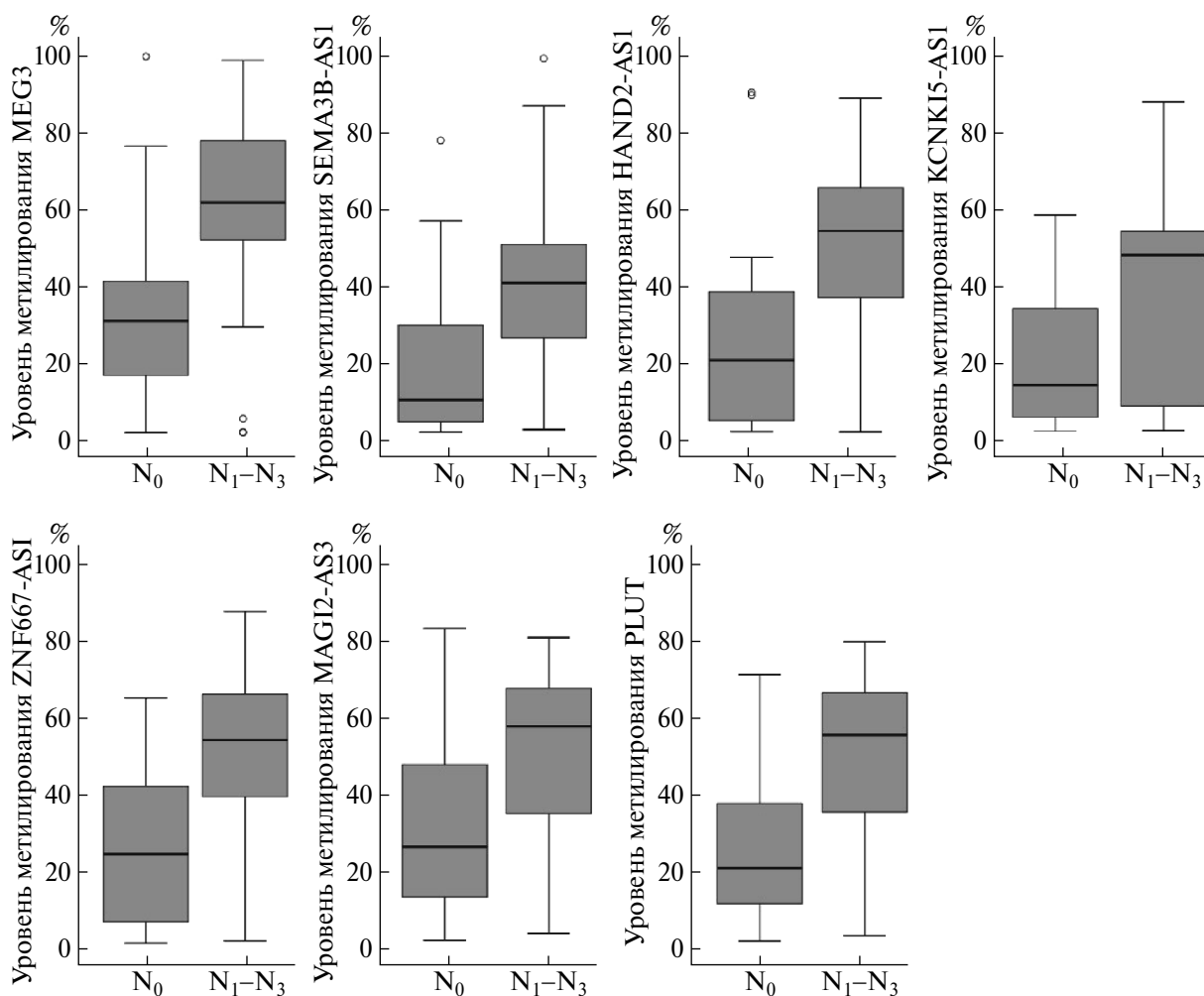


Рис. 3. Уровень метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* в образцах опухолей молочной железы с метастазами (N_1-N_3) и без метастазов (N_0).

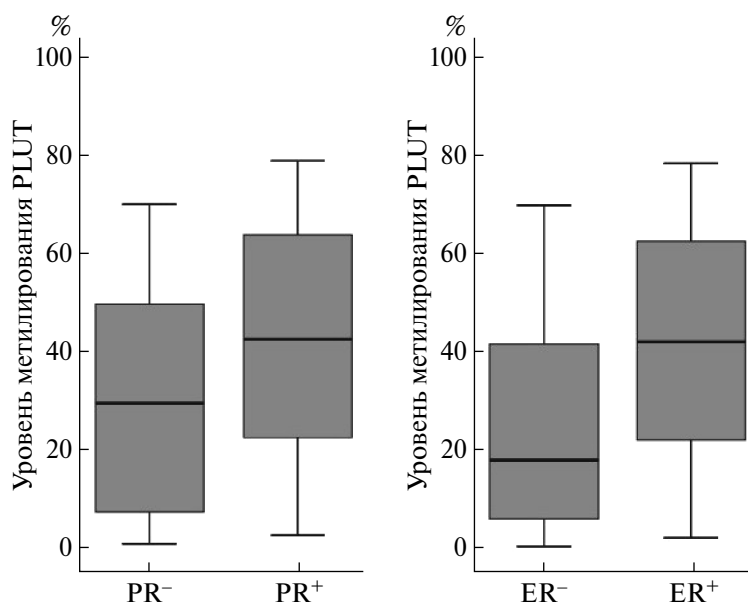


Рис. 4. Уровень метилирования гена днРНК *PLUT* в образцах опухолей молочной железы, не экспрессирующих рецепторы прогестерона (PR^-) и эстрогена (ER^-) и экспрессирующих рецепторы прогестерона (PR^+) и эстрогена (ER^+).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе впервые установлено гиперметилирование четырех генов днРНК (*HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) в образцах РМЖ и показана вовлеченность метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) в развитие и прогрессию РМЖ. Эти данные указывают на участие данных днРНК в патогенезе РМЖ и позволяют предполагать их супрессорную роль.

Метилирование генов *MEG3*, *SEMA3B-AS1* и *ZNF667-AS1* при РМЖ было показано ранее [22–24]. В единичных работах сообщается о гиперметилировании гена днРНК *MEG3* при РМЖ, причем предотвращение метилирования *MEG3* может иметь значение для снижения химиорезистентности опухолей молочной железы, так как днРНК *MEG3* препятствует пролиферации и метастазированию опухолевых клеток [22, 25]. Аберрантное метилирование гена днРНК *MEG3* показано и при раке яичников, который, как и РМЖ, относится к гормонозависимым видам рака [26].

Ранее мы показали увеличение уровня метилирования *SEMA3B-AS1* и *ZNF667-AS1* в опухолевой ткани молочной железы по сравнению с парной нормальной тканью, а также корреляцию высокого уровня метилирования с более поздними стадиями РМЖ на меньшей выборке [22], что получило подтверждение в текущем исследовании на большей выборке образцов. Сообщается о снижении уровня экспрессии *ZNF667-AS1* на ранней стадии канцерогенеза молочной железы, предположительно во время клеточной иммортализации, предшествующей развитию инвазивного люминального РМЖ [23].

Результаты проведенного нами анализа гиперметилирования генов *MEG3*, *SEMA3B-AS1* и *ZNF667-AS1* согласуются с данными о супрессорных функциях днРНК, кодируемых этими генами, и подчеркивают важную роль их метилирования в развитии и прогрессии РМЖ [22, 25, 27, 28].

Метилирование генов *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* ранее обнаружено и в опухолях других локализаций. Например, анализ депонированных в базу TCGA данных о метилировании полного генома человека выявил очевидное гиперметилирование островков CpG122 и CpG74 в промоторной области генов *HAND2-AS1* и *HAND2* в тканях рака эндометрия [29]. Отмечено также [30], что снижение экспрессии гена *HAND2-AS1* вызвано гиперметилированием промотора, и этот ген действует как супрессор опухолевого роста в клеточных лини-

ях высокозлокачественной серозной карциномы яичника.

Метилирование промотора гена *KCNK15-AS1* обнаружено при раке желудка, причем частота метилирования на более поздних стадиях заболевания была выше, чем на ранних [31].

Гиперметилирование промотора гена *MAGI2-AS3*, опосредованное активацией DNMT1, приводит к снижению экспрессии *MAGI2-AS3* при плоскоклеточном раке гортани, тем самым способствуя пролиферации, миграции и инвазии клеток посредством эпителиально-мезенхимального перехода [32].

Гиперметилирование промотора гена днРНК *PLUT* является прогностическим фактором у пациентов с ранней (I) стадией аденокарциномы легкого с высоким риском раннего рецидива [33].

Специфичное гиперметилирование промоторных участков генов часто приводит к потере или снижению их функции, что характерно для супрессоров опухолевого роста. Рассмотренные нами гены днРНК проявляют в РМЖ главным образом супрессорные свойства. Так, известно, что механизмы, посредством которых *MEG3* проявляет супрессорные свойства, включают активацию путей p53 и Rb при одновременном ингибировании их негативного регулятора MDM2 [34]. *MEG3* участвует в ингибировании эпителиально-мезенхимального перехода, связывая miR-421, как “губка”, и впоследствии усиливая регуляцию E-кадгерина, что приводит к снижению белков клеточной инвазии [35]. Кроме того, *MEG3* принимает участие в предотвращении ангиогенеза, регуляции сигнальных путей PI3K/Akt и Wnt/ β -катенин [36]. Таким образом, *MEG3* ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток. Соответственно, эпигенетические изменения в промоторе гена *MEG3* препятствуют выполнению ее функций.

Установлено, что днРНК *SEMA3B-AS1* действует как новый супрессор РМЖ; снижение экспрессии этой днРНК коррелирует с повышенным метастазированием и плохим прогнозом у пациентов с РМЖ [27]. Определен новый путь прогрессирования трижды негативного РМЖ через ось SMAD3/*SEMA3B-AS1*/miR-3940-3p/KLLN. Предполагается, что *SEMA3B-AS1* может служить потенциальным биомаркером и терапевтической мишенью при трижды негативном РМЖ.

ДнРНК *ZNF667-AS1* препятствует пролиферации опухолевых клеток, метастазированию и ангиогенезу рака желудка в результате активации экспрессии E-кадгерина и ингибирования экспрессии N-кадгерина и VEGFA, т.е. действу-

ет как опухолевый супрессор [28]. Кроме того, днРНК ZNF667-AS1, связывая, как “губка”, miR-1290, способствует экспрессии ABLIM1, тем самым подавляя прогрессирование рака носоглотки [37]. Сверхэкспрессия ZNF667-AS1 может ингибировать пролиферацию, миграцию и инвазию клеток колоректального рака, что может быть связано с высоким уровнем экспрессии ANK2 и низким уровнем JAK2 [38].

Показано снижение экспрессии MAGI2-AS3 в тканях РМЖ по сравнению с нормальными тканями и отмечено, что MAGI2-AS3 может действовать как супрессор опухолевого роста, нацеленный на путь Fas/FasL, и подавлять пролиферацию клеток РМЖ [39]. Возможно, что MAGI2-AS3 модулирует экспрессию Fas/FasL путем взаимодействия с микроРНК. Таким образом, MAGI2-AS3 может быть потенциальной терапевтической мишенью при РМЖ. Сообщается также о супрессорных свойствах MAGI2-AS3 и при раке предстательной железы, где ингибирование прогрессирования опухоли достигается путем нацеливания на miR-142-3p [40]. При раке мочевого пузыря MAGI2-AS3 в основном взаимодействует с CCDC19, подавляя миграцию, пролиферацию и инвазию раковых клеток [41]. При гепатоцеллюлярной карциноме MAGI2-AS3 действует на miR-374b-5p/SMG1 и подавляет пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [42]. При немелкоклеточном раке легкого MAGI2-AS3 действует как супрессор опухоли, выступая в качестве “губки” для miR-25, а взаимодействие между MAGI2-AS3 и miR-25 приводит к увеличению экспрессии RECK — мишени miR-25 [43].

Однако сообщается, что MAGI2-AS3 способствует миграции и инвазии клеток, связываясь с miR-141/200a и повышая экспрессию ZEB1, что позволяет предположить ее онкогенную роль в прогрессировании рака желудка [44]. По-видимому, можно говорить о двойственных чертах этой днРНК.

Обнаружено, что днРНК HAND2-AS1 служит “губкой” для miR-3118, уровень экспрессии которой повышен в клеточных линиях РМЖ [45]. Таким образом, днРНК HAND2-AS1 препятствует прогрессированию РМЖ за счет снижения экспрессии miR-3118. Кроме того, днРНК HAND2-AS1 ингибирует процесс развития РМЖ, усиливая экспрессию PHLPP2 — нижестоящей мишени miR-3118. Таким образом, HAND2-AS1 подавляет развитие РМЖ, действуя на ось miR-3118/PHLPP2, что позволяет рассматривать HAND2-AS1 как потенциальную терапевтическую мишень при РМЖ [45]. Следует отметить, что днРНК HAND2-AS1 проявляет супрессорные свойства и при других видах опу-

холей, например при колоректальном раке [46], раке пищевода [47] и раке яичников [48].

Лишь в единственной работе [49] сообщается, что HAND2-AS1 оказывает онкогенное действие, способствуя самообновлению стволовых клеток рака печени.

днРНК KCNK15-AS1, связываясь с мРНК KCNK15, ингибирует ее трансляцию и, взаимодействуя с MDM2, вызывает убиквитинирование REST, что способствует транскрипции *PTEN* и инактивации АКТ-пути при раке поджелудочной железы [50]. В итоге KCNK15-AS1 подавляет пролиферацию, миграцию и эпителиально-мезинхимальный переход клеток рака поджелудочной железы.

Однако сообщается о сверхэкспрессии KCNK15-AS1 в тканях аденокарциномы легкого, а также о корреляции между высоким уровнем экспрессии KCNK15-AS1 и плохим прогнозом при этом виде рака [51]. Предполагается, что при раке легкого KCNK15-AS1 функционирует как онкоген, регулируя ось miR-202/miR-370/EGFR.

Следовательно, исследуемые нами гены днРНК могут играть роль и супрессоров опухолевого роста, и онкогенов в зависимости от микроокружения опухоли.

Показана возможность клинического использования некоторых гиперметилованных генов днРНК. Так, метилирование гена *MEG3* в плазме крови может служить диагностическим и прогностическим биомаркером рака шейки матки [52].

Необходимо более углубленное изучение генов-мишеней этих днРНК, регулируемых метилированием. Предварительный биоинформатический анализ, выполненный нами с применением баз данных RNAInter (<http://www.rnainter.org/>) и LncRRISearch (<http://rtools.cbrc.jp/LncRRISearch/>), показал, что возможными мишенями днРНК HAND2-AS1 могут быть мРНК генов *HIF1A* и *BCL2*, которые играют существенную роль в ангиогенезе и апоптозе.

Таким образом, полученные нами результаты согласуются с опухолесупрессорными функциями семи днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) и дополняют опубликованные данные о важной роли гиперметилования их генов в развитии и прогрессии РМЖ. Однако требуется дальнейшее изучение функций и молекулярных механизмов действия этих днРНК, в частности выяснения факторов, определяющих их двойственную роль и как супрессоров, и как онкогенов в разных видах рака.

Следует подчеркнуть, что метилирование промоторных CpG-островков этих генов вносит вклад в дерегуляцию исследуемых днРНК и непосредственно влияет на функции этой группы днРНК, участвующих в различных сигнальных путях.

Кроме того, исследованные гиперметилированные гены днРНК могут рассматриваться как потенциальные диагностические и прогностические биомаркеры и терапевтические мишени при РМЖ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 22-75-00132).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам Институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование рассмотрено и одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (протоколы заседаний № 1 от 03.03.2022 и № 4 от 31.08.2023). От всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в работе.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249. doi: 10.3322/caac.21660
2. Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. **490**(7418), 61–70. doi: 10.1038/nature11412
3. Cuzick J. (2017) Preventive therapy for cancer. *Lancet Oncol.* **18**(8), 472–482. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30536-3
4. Harbeck N., Gnant M. (2017) Breast cancer. *Lancet*. **389**(10074), 1134–1150. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8
5. Rahman M.M., Brane A.C., Tollefsbol T.O. (2019) MicroRNAs and epigenetics strategies to reverse breast cancer. *Cells*. **8**(10), 1214. doi: 10.3390/cells8101214
6. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. **31**(1), 27–36. doi: 10.1093/carcin/bgp220
7. Rose M., Kloten V., Noetzel E., Gola L., Ehling J., Heide T., Meurer S.K., Gaiko-Shcherbak A., Sechi A.S., Huth S., Weiskirchen R., Klaas O., Antonopoulos W., Lin Q., Wagner W., Veeck J., Gremse F., Steitz J., Knüchel R., Dahl E. (2017) ITIH5 mediates epigenetic reprogramming of breast cancer cells. *Mol. Cancer*. **16**(1), 44. doi: 10.1186/s12943-017-0610-2
8. Jeong G.Y., Park M.K., Choi H.J., An H.W., Park Y.U., Choi H.J., Park J., Kim H.Y., Son T., Lee H., Min K.W., Oh Y.H., Lee J.Y., Kong G. (2021) NSD3-Induced methylation of H3K36 activates NOTCH signaling to drive breast tumor initiation and metastatic progression. *Cancer Res.* **81**(1), 77–90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0360
9. Klinge C.M. (2018) Non-coding RNAs: long non-coding RNAs and microRNAs in endocrine-related cancers. *Endocr. Relat. Cancer*. **25**(4), 259–282. doi: 10.1530/ERC-17-0548
10. Venkatesh J., Wasson M.D., Brown J.M., Fernando W., Marcato P. (2021) LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack. *Cancer Lett.* **509**, 81–88. doi: 10.1016/j.canlet.2021.04.002
11. Fazal F.M., Chang H.Y. (2016) lncRNA structure: message to the heart. *Mol. Cell*. **64**(1), 1–2. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.030
12. Kim J., Piao H.L., Kim B.J., Yao F., Han Z., Wang Y., Xiao Z., Siverly A.N., Lawhon S.E., Ton B.N., Lee H., Zhou Z., Gan B., Nakagawa S., Ellis M.J., Liang H., Hung M.C., You M.J., Sun Y., Ma L. (2018) Lo. *J. Cancer*. **108**(12), 2419–2425. doi: 10.1038/bjc.2013.233
13. Huang J., Zhang S.Y., Gao Y.M., Liu Y.F., Liu Y.B., Zhao Z.G., Yang K. (2014) MicroRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Cell Prolif.* **47**(4), 277–286. doi: 10.1111/cpr.12109
14. Union for International Cancer Control (UICC) (2017) TNM Classification of Malignant Tumours. Eds Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Oxford, UK: John Wiley and Sons, 241 p.
15. World Medical Association (2013) World Medical Association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. **310**(20), 2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053
16. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdennyy A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Uroshlev L.A., Fridman M.V., Brovkina O.I., Apanovich N.V., Karpukhin A.V., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. (2022) 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.* **23**(3), 1300. doi: 10.3390/ijms23031300
17. Hattermann K., Mehdorn H.M., Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. (2008) A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal. Biochem.* **377**(1), 62–71. doi: 10.1016/j.ab.2008.03.014
18. Selezneva A.D., Filippova E.A., Selezneva A.D., Lukina S.S., Pronina I.V., Ivanova N.A., Kazubskaya T.P., Burdennyy A.M., Braga E.A., Loginov V.I.

- (2022) Hypermethylation of long non-coding RNA genes group in the breast cancer development and progression. *Bull. Exp. Biol. Med.* **173**(6), 765–769. doi: 10.1007/s10517-022-05627-8
23. Vrba L., Futscher B.W. (2017) Epigenetic silencing of MORT is an early event in cancer and is associated with luminal, receptor positive breast tumor subtypes. *J. Breast Cancer.* **20**(2), 198–202. doi: 10.4048/jbc.2017.20.2.198
24. Di Fiore R., Suleiman S., Drago-Ferrante R., Felix A., O'Toole S.A., O'Leary J.J., Ward M.P., Beirne J., Yordanov A., Vasileva-Slaveva M., Subbannayya Y., Pentimalli F., Giordano A., Calleja-Agius J. (2021) LncRNA MORT (ZNF667-AS1) in cancer-is there a possible role in gynecological malignancies? *Int. J. Mol. Sci.* **22**(15), 7829. doi: 10.3390/ijms22157829
25. Li H., Wang P., Liu J., Liu W., Wu X., Ding J., Kang J., Li J., Lu J., Pan G. (2020) Hypermethylation of lncRNA MEG3 impairs chemosensitivity of breast cancer cells. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**(9), e23369. doi: 10.1002/jcla.23369
26. Burdennyy A.M., Filippova E.A., Ivanova N.A., Lukina S.S., Pronina I.V., Loginov V.I., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Utkin D.O., Braga E.A., Kushlinskii N.E. (2021) Hypermethylation of genes in new long noncoding RNA in ovarian tumors and metastases: a dual effect. *Bull. Exp. Biol. Med.* **171**(3), 370–374. doi: 10.1007/s10517-021-05230-3
27. Hu J., Huang H., Xi Z., Ma S., Ming J., Dong F., Guo H., Zhang H., Zhao E., Yao G., Yang L., Zhang F., Zheng W., Chen H., Huang T., Li L. (2022) LncRNA SEMA3B-AS1 inhibits breast cancer progression by targeting miR-3940/KLLN axis. *Cell Death Dis.* **13**(9), 800. doi: 10.1038/s41419-022-05189-7
28. Yu C., Chen W., Cai Y., Du M., Zong D., Qian L., Jiang X., Zhu H. (2022) The lncRNA ZNF667-AS1 inhibits propagation, invasion, and angiogenesis of gastric cancer by silencing the expression of N-cadherin and VEGFA. *J. Oncol.* 2022–3579547. doi: 10.1155/2022/3579547
29. Yang X., Wang C.C., Lee W.Y.W., Trovik J., Chung T.K.H., Kwong J. (2018) Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits invasion and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through inactivating neuromedin U. *Cancer Lett.* **28**(413), 23–34. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.028
30. Gokulnath P., de Cristofaro T., Manipur I., Di Palma T., Soriano A.A., Guarracino M.R., Zannini M. (2020) Long non-coding RNA HAND2-AS1 acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(11), 4059. doi: 10.3390/ijms21114059
31. Zhang H., Zhang Z., Wang D. (2019) Epigenetic regulation of lncRNA KCNK15-AS1 in gastric cancer. *Cancer Manag. Res.* **11**, 8589–8602. doi: 10.2147/CMAR.S186002
32. Wang J., Yang C., Cao H., Yang J., Meng W., Yu M., Yu L., Wang B. (2023) Hypermethylation-mediated lncRNA MAGI2-as3 downregulation facilitates malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma via interacting with SPT6. *Cell Transplant.* **32**, 9636897231154574. doi: 10.1177/09636897231154574
33. Kim-Wanner S.Z., Assenov Y., Nair M.B., Weichenhan D., Benner A., Becker N., Landwehr K., Kuner R., Sültmann H., Esteller M., Koch I., Lindner M., Meister M., Thomas M., Bieg M., Klingmüller U., Schlesner M., Warth A., Brors B., Seifried E., Bönig H., Plass C., Risch A., Muley T. (2020) Genome-wide DNA methylation profiling in early stage I lung adenocarcinoma reveals predictive aberrant methylation in the promoter region of the long noncoding RNA PLUT: an exploratory study. *J. Thorac. Oncol.* **15**(8), 1338–1350. doi: 10.1016/j.jtho.2020.03.023
34. Al-Rugeebah A., Alanazi M., Parine N.R. (2019) MEG3: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **25**(3), 859–874. doi: 10.1007/s12253-019-00614-3
35. Zhang W., Shi S., Jiang J., Li X., Lu H., Ren F. (2017) LncRNA MEG3 inhibits cell epithelial-mesenchymal transition by sponging miR-421 targeting E-cadherin in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **91**, 312–319. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.085
36. Zhang L., Liang X., Li Y. (2017) Long non-coding RNA MEG3 inhibits cell growth of gliomas by targeting miR-93 and inactivating PI3K/AKT pathway. *Oncol. Rep.* **38**(4), 2408–2416. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5871>
37. Chen X., Huang Y., Shi D., Nie C., Luo Y., Guo L., Zou Y., Xie C. (2020) LncRNA ZNF667-AS1 promotes ABLIM1 expression by adsorbing microRNA-1290 to suppress nasopharyngeal carcinoma cell progression. *Oncotargets Ther.* **20**(13), 4397–4409. doi: 10.2147/OTT.S245554
38. Zhuang L., Ding W., Ding W., Zhang Q., Xu X., Xi D. (2021) lncRNA ZNF667-AS1 (NR_036521.1) inhibits the progression of colorectal cancer via regulating ANK2/JAK2 expression. *J. Cell. Physiol.* **236**(3), 2178–2193. doi: 10.1002/jcp.30004
39. Yang Y., Yang H., Xu M., Zhang H., Sun M., Mu P., Dong T., Du S., Liu K. (2018) Long non-coding RNA (lncRNA) MAGI2-AS3 inhibits breast cancer cell growth by targeting the Fas/FasL signalling pathway. *Hum. Cell.* **31**(3), 232–241. doi: 10.1007/s13577-018-0206-1
40. Hu R., Wu P., Liu J. (2022) LncRNA MAGI2-AS3 inhibits prostate cancer progression by targeting the miR-142-3p. *Hormon. Metab. Res.* **54**(11), 754–759. doi: 10.1055/a-1891-6864
41. Wang F., Zu Y., Zhu S., Yang Y., Huang W., Xie H., Li G. (2018) Long noncoding RNA MAGI2-AS3 regulates CCDC19 expression by sponging miR-15b-5p and suppresses bladder cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun.* **507**(1–4), 231–235. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.013
42. Yin Z., Ma T., Yan J., Shi N., Zhang C., Lu X., Hou B., Jian Z. (2019) LncRNA MAGI2-AS3 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting the miR-374b-5p/SMG1 signaling pathway. *J. Cell Physiol.* **234**(10), 18825–18836. doi: 10.1002/jcp.28521

43. Sui Y., Chi W., Feng L., Jiang J. (2020) LncRNA MAGI2-AS3 is downregulated in non-small cell lung cancer and may be a sponge of miR-25. *BMC Pulmonol. Med.* **20**(1), 59. doi: 10.1186/s12890-020-1064-7
44. Li D., Wang J., Zhang M., Hu X., She J., Qiu X., Zhang X., Xu L., Liu Y., Qin S. (2020) LncRNA MAGI2-AS3 is regulated by BRD4 and promotes gastric cancer progression via maintaining ZEB1 overexpression by sponging miR-141/200a. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **19**, 109–123. doi: 10.1016/j.omtn.2019.11.003
45. Dong G., Wang X., Jia Y., Jia Y., Zhao W., Zhang J., Tong Z. (2020) HAND2-AS1 works as a ceRNA of miR-3118 to suppress proliferation and migration in breast cancer by upregulating PHLPP2. *Biomed. Res. Int.* **2020**, 8124570. doi: 10.1155/2020/8124570
46. Jiang Z., Li L., Hou Z., Liu W., Wang H., Zhou T., Li Y., Chen S. (2020) LncRNA HAND2-AS1 inhibits 5-fluorouracil resistance by modulating miR-20a/PDCD4 axis in colorectal cancer. *Cell. Signal.* **66**, 109483.
47. Yan Y., Li S., Wang S., Rubegni P., Tognetti L., Zhang J., Yan L. (2019) Long noncoding RNA HAND2-AS1 inhibits cancer cell proliferation, migration, and invasion in esophagus squamous cell carcinoma by regulating microRNA-21. *J. Cell. Biochem.* **120**(6), 9564–9571.
48. Chen J., Lin Y., Jia Y., Xu T., Wu F., Jin Y. (2019) LncRNA HAND2-AS1 exerts antioncogenic effects on ovarian cancer via restoration of BCL2L1 as a sponge of microRNA-340-5p. *J. Cell. Physiol.* **234**, 23421–23436. <https://doi.org/10.1002/jcp.28911>
49. Wang Y., Zhu P., Luo J., Wang J., Liu Z., Wu W., Du Y., Ye B., Wang D., He L., Ren W., Wang J., Sun X., Chen R., Tian Y., Fan Z. (2019) LncRNA HAND2-AS1 promotes liver cancer stem cell self-renewal via BMP signaling. *EMBO J.* **38**(17), e101110. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101110>
50. He Y., Yue H., Cheng Y., Ding Z., Xu Z., Lv C., Wang Z., Wang J., Yin C., Hao H., Chen C. (2021) ALKBH5-mediated m6A demethylation of KCNK15-AS1 inhibits pancreatic cancer progression via regulating KCNK15 and PTEN/AKT signaling. *Cell Death Dis.* **12**(12), 1121. doi: 10.1038/s41419-021-04401-4
51. Peng J., Chen X.L., Cheng H.Z., Xu Z.Y., Wang H., Shi Z.Z., Liu J., Ning X.G., Peng H. (2019) Silencing of KCNK15-AS1 inhibits lung cancer cell proliferation via upregulation of miR-202 and miR-370. *Oncol. Lett.* **18**(6), 5968–5976. doi: 10.3892/ol.2019.10944
52. Zhang J., Yao T., Lin Z., Gao Y. (2017) Aberrant methylation of MEG3 functions as a potential plasma-based biomarker for cervical cancer. *Sci. Rep.* **7**(1), 6271. doi: 10.1038/s41598-017-06502-7

A Group of New Hypermethylated Long Non-Coding RNA Genes Associated with the Development and Progression of Breast Cancer

E. A. Filippova^{1, *}, V. I. Loginov¹, S. S. Lukina¹, A. M. Burdennyy¹,
I. V. Pronina¹, T. P. Kazubskaya², and E. A. Braga¹

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

² Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

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

Breast cancer is the most common type of cancer among women. The study of the mechanisms of metastasis, the main cause of death from breast cancer, as well as the search for new markers for early diagnosis and prognosis of breast cancer is an extremely topical issue. New perspectives in the diagnosis and treatment of breast cancer are opened by the mechanisms of gene regulation involving non-coding RNAs, in particular, long non-coding RNAs (lncRNAs). In this work, we analyzed the methylation level of seven lncRNA genes (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3*, and *PLUT*) by quantitative methyl-specific PCR on a set of 79 paired (tumor/normal) samples breast cancer. Hypermethylation of all seven lncRNA genes was revealed, and hypermethylation of *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* and *PLUT* was detected by us in breast cancer for the first time. It was found that the level of methylation of the studied lncRNA genes correlated statistically significantly with the stage of the tumor process, the size of the tumor, and the presence of metastases in the lymph nodes. Thus, methylation of the seven studied lncRNA genes is associated with the development and progression of breast cancer, and these genes can be useful as potential markers in the diagnosis and prognosis of breast cancer.

Keywords: long non-coding RNA genes, DNA methylation, breast cancer