

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092+575:599.9

Пронина И.В.<sup>1</sup>, Губенко М.С.<sup>1</sup>, Бурдённый А.М.<sup>1,2</sup>, Казубская Т.П.<sup>3</sup>, Брага Э.А.<sup>1,4</sup>, Логинов В.И.<sup>1,4</sup>

### Роль метилирования в регуляции экспрессии гена *DAPK1* и связанных с ним генов микроРНК при немелкоклеточном раке легкого

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук,

119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

115478, Москва, Каширское ш., д. 23;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»,

115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

**Актуальность.** Одним из самых распространенных злокачественных новообразований является рак легкого. Его самой распространенной формой, более 85% всех случаев, является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Одним из генов, тесно связанным с возникновением и прогрессией этого вида рака, является ген *DAPK1*, эпигенетическая регуляция которого, происходит на разных уровнях, в частности, метилирование промоторного CpG-островка гена или же влияние изменения уровня экспрессии микроРНК, для которых ген *DAPK1* является геном-мишенью. Вопрос о влиянии метилирования и/или микроРНК на регуляцию экспрессии мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ остается открытым.

**Цель.** Исследование изменений уровня экспрессии и/или метилирования микроРНК и их гена-мишени *DAPK1* при НМРЛ.

**Методика.** Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Высокмолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня метилирования проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени определены уровни экспрессии 4 микроРНК и их предполагаемого гена-мишени *DAPK1*. Статистический анализ выполнен с использованием программного пакета IBM SPSS 22. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

**Результаты.** С применением метилспецифичной ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ( $p < 0.05$ ) увеличение уровня метилирования гена *DAPK1* в образцах опухолей по сравнению с парной гистологически нормальной тканью легкого. Показано, что уровень экспрессии мРНК гена *DAPK1* статистически значимо ассоциирован как с изменением уровня метилирования промоторного CpG-островка гена *DAPK1* ( $R_s = -0.517$ ,  $p = 0.002$ ), так и с изменением уровня экспрессии исследованных микроРНК. В результате анализа уровней экспрессии *DAPK1* и микроРНК были составлены две пары miR-339-3p – *DAPK1* ( $R_s = -0.476$ ,  $p = 0.004$ ) и miR-375 – *DAPK1* ( $R_s = -0.354$ ,  $p = 0.037$ ), позволяющие говорить о существенном влиянии этих микроРНК на регуляцию активности гена *DAPK1*.

**Заключение.** Обнаруженные нами новые закономерности представляют интерес для понимания механизмов развития НМРЛ и могут лечь в основу диагностики и прогноза течения этой болезни, а также помочь скорректировать ход лечения с учетом патофизиологических особенностей опухоли.

**Ключевые слова:** метилирование; экспрессия; апоптоз; НМРЛ

**Для цитирования:** Пронина И.В., Губенко М.С., Бурдённый А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Роль метилирования в регуляции экспрессии гена *DAPK1* и связанных с ним генов микроРНК при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 5–13.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.5-13

**Участие авторов:** проведение исследования по экспрессии – Пронина И.В.; обработка материала, проведение исследования – Губенко М.С.; проведение исследования по метилированию – Бурдённый А.М.; сбор и описание материала – Казубская Т.П.; общее руководство исследованием – Брага Э.А.; концепция и дизайн исследования, подготовка иллюстративного материала, редактирование статьи – Логинов В.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Бурдённый Алексей Михайлович, e-mail: burdennyu@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена за счет средств государственного задания № FGFU-2023-0001.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.07.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Pronina I.V.<sup>1</sup>, Gubenko M.S.<sup>1</sup>, Burdenny A.M.<sup>1,2</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>3</sup>, Braga E.A.<sup>1,4</sup>, Loginov V.I.<sup>1,4</sup>**The role of methylation in regulation of the expression of the *DAPK1* gene and associated microRNA genes in non-small cell lung cancer**<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;<sup>2</sup>Emanuel Institute for Biochemical Physics, Kosygina St. 4, Moscow, 119334, Russian Federation;<sup>3</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow, 115478, Russian Federation;<sup>4</sup>Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moskvorechye 1, Moscow, 115522, Russian Federation

**Background.** Lung cancer is one of the most common malignant neoplasms. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most prevalent form of lung cancer, that accounts for more than 85% for all cases. The *DAPK1* gene is one of the genes closely associated with the emergence and progression of this cancer. Epigenetic regulation of the *DAPK1* gene occurs at different levels, in particular, by CpG island gene promoter methylation or by changes in the expression level of microRNAs, for which the *DAPK1* gene is a target gene. The question of the effect of methylation and/or microRNAs on the regulation of the *DAPK1* gene mRNA expression in NSCLC remains open.

**Aim.** Detection of changes in the level of expression and/or methylation of microRNAs and their target gene *DAPK1* in NSCLC.

**Methods.** Samples of NSCLC tumors were collected and clinically characterized at the Research Institute of Clinical Oncology of the Blokhin National Research Center of Oncology. High-molecular DNA was isolated from the tissue by a standard method. The methylation level was determined using bisulfite DNA conversion and quantitative methyl-specific PCR (MS-PCR) with real-time detection. The levels of expression of 4 microRNAs and their putative target gene *DAPK1* were determined by real-time PCR (RT-PCR). Statistical analysis was performed using an IBM SPSS 22 software package. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Results.** The analysis with MS RT-PCR showed a statistically significant ( $p < 0.05$ ) increase in the level of methylation of the *DAPK1* gene in tumor samples in comparison with paired histologically normal lung tissue. The level of the *DAPK1* gene mRNA expression was statistically significantly associated with both the change in the methylation level of the *DAPK1* gene promoter CpG island ( $R_s = -0.517$ ,  $p = 0.002$ ) and the change in the expression of studied microRNA. The analysis of expression levels of *DAPK1* and microRNAs allowed creation of two pairs, miR-339-3p – *DAPK1* ( $R_s = -0.476$ ,  $p = 0.004$ ) and miR-375 – *DAPK1* ( $R_s = -0.354$ ,  $p = 0.037$ ), which suggested a significant effect of these microRNAs on the regulation of *DAPK1* gene activity.

**Conclusion.** Thus, the newly discovered patterns are of interest for understanding the mechanisms of NSCLC development. They can form a basis for diagnosis and prognosis of this disease and also help adjustment of the treatment taking into account pathological features of the tumor.

**Keywords:** methylation; expression; apoptosis; NSCLC

**For citation:** Pronina I.V., Gubenko M.S., Burdenny A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I. The role of methylation in regulating the expression of the *DAPK1* gene and associated microRNA genes in non-small cell lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 5–13. (in Russian)  
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.5-13

**Author's contribution:** conducting an expression study – Pronina I.V.; processing the material, conducting the study – Gubenko M.S.; conducting a methylation study – Burdenny A.M.; collecting and describing the material – Kazubskaya T.P., general management of the study – Braga E.A.; concept and design of the study, preparation of illustrative material, editing of the article – Loginov V.I. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** **Alexey M. Burdenny**, Candidate of Biological Sciences, L.S.S. lab. Pathogenomics and Transcriptomics of FSBSI IGPP, e-mail: burdenny@gmail.com

**Information about the authors:**Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>Braga E.A., <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

**Financing.** The work was funded by the Ministry of science and higher education of the Russian Federation, state assignment № FGFU-2023-0001 for 2023-2024.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 06.07.2023

Accepted 12.07.2023

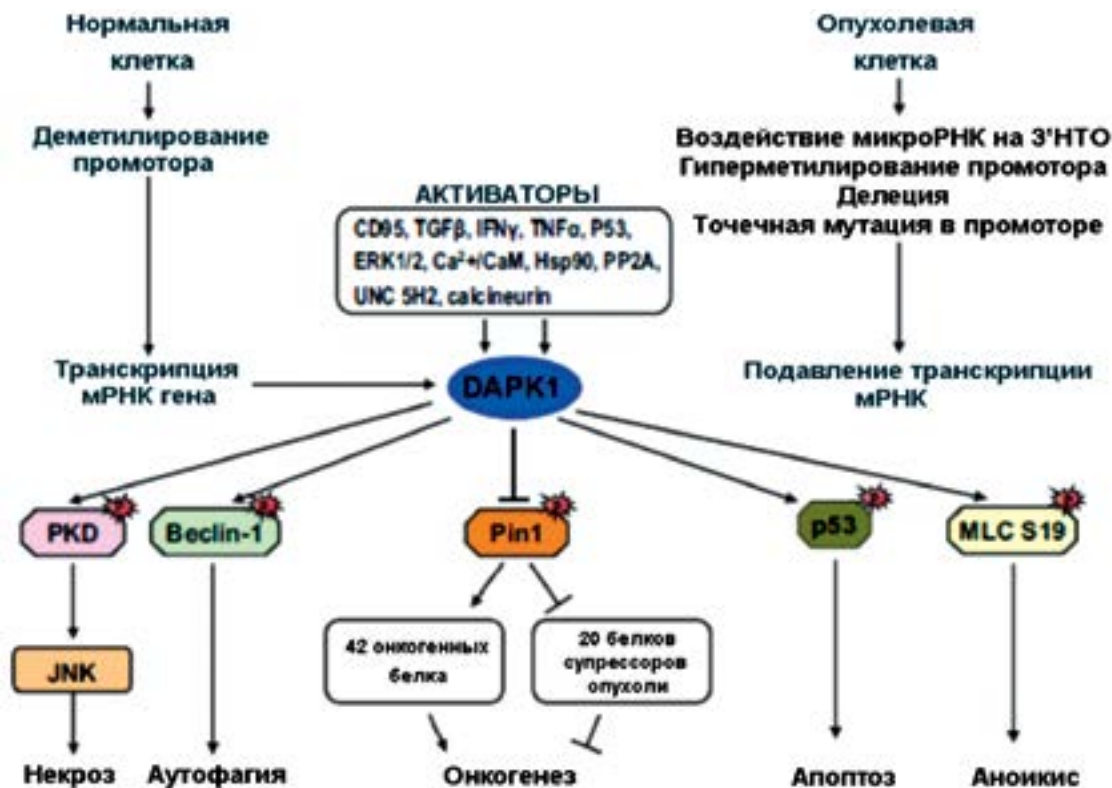
Published 20.09.2023

**Введение**

Рак является одной из ведущих причин смерти во всем мире [1]. В российской популяции онкобольных в 2021 г. рак легкого диагностирован у 56 428 человек, в то же время у 46 792 человек диагностирован неблагоприятный исход [2]. Следует отметить, что механизмы образования и прогрессии опухоли связаны с нарушением динамической регуляции клеточных процессов, протекающих в нормальных тканях, в том числе и ткани легкого, и обусловлены как генетическими, так и эпигенетическими факторами, которые играют критическую роль в регуляции экспрессии генов-супрессоров опухоли [3, 4]. Одним из таких генов, участвующих в подавлении прогрессии опухоли разных локализаций, является ген *DAPK1* (рис. 1) [5, 6].

Ген *DAPK1* (*Death-associated protein kinase*, ассоциированная с апоптозом протеинкиназа 1) был открыт

при изучении апоптоза индуцированного интерфероном- $\gamma$  [8] и локализован в районе 9q21.33. *DAPK1* представляет собой киназу Ser/Thr, белок с молекулярной массой 160 кДа, состоящий из 1430 аминокислот, объединенных в протеинкиназный домен, кальций-кальмодулин связывающий сайт, область связывания с цитоскелетом клетки и домен смерти [9], которая опосредует апоптоз, индуцированный различными стимулами [8]. Последующие исследования показали, что активация и/или сверхэкспрессия *DAPK1* способствует каспазозависимому или – независимому апоптозу, аутофагии, некрозу и апоптозоподобной гибели клеток [8, 10]. Помимо роли, способствующей гибели клеток, *DAPK1* играет важную роль в росте клеток, онкогенезе, воспалении [5, 6, 8]. Так, на ранней стадии рака *DAPK1* может



**Рис. 1.** Молекулярные механизмы, с помощью которых DAPK1 подавляет рак. Функция DAPK1 может быть снижена на нескольких уровнях, как за счет метилирования ДНК, так и воздействия ряда микроРНК-а на мРНК гена DAPK1. DAPK1 контролирует два основных регулятора сигнальных путей в клетке – активируя p53 и/или ингибируя Pin1, что приводит к остановке роста клеток и апоптозу. «р» в верхнем углу многоугольника – процесс фосфорилирования. 3'НТО – 3' нетранслируемая область (адаптирован из [7]).

**Fig. 1.** Molecular mechanisms of suppressing cancer by DAPK1. The functioning of DAPK1 can be reduced at several levels, both due to DNA methylation and the effect of a number of microRNAs -on the mRNA of the *DAPK1* gene. DAPK1 controls two main regulators of signaling pathways in the cell – activating p53 and/or inhibiting Pin1, which leads to cell growth arrest and apoptosis. The “p” in the upper corner of the polygon is the phosphorylation process. 3'НТО – 3' untranslated area (adapted from [7]).

подавлять рост опухоли и метастазирования за счет усиления апоптоза, а на поздних стадиях — может ингибировать движение и адгезию клеток, вмешиваясь в работу белков интегринов [11].

Впервые, связь между геном *DAPK1* и раком предположили, когда было выявлено снижение уровня его экспрессии в опухолевых тканях человека [6]. Эти наблюдения, впоследствии, были подтверждены, когда обнаружили, что промоторная область *DAPK1* значительно подвергалась метилированию в 30 различных типах опухолей человека по сравнению с соответствующей нормальной тканью, включая злокачественные новообразования легких, толстой кишки, груди, головы и шеи, почек, печени и В-клеток [5, 12, 13]. При этом, восстановление физиологических уровней *DAPK1*, в частности, при карциноме Льюиса, для которой показана высокая метастатическая активность, приводило к эффективному подавлению ее способности образовывать метастазы. Исследование было проведено на мышах [14]. Хотя гиперметилирование промоторного CpG-островка гена *DAPK1* часто указывается как основной механизм инактивации этого гена при раке, белок *DAPK1* все же может экспрессироваться и в присутствии гиперметилирования в первичных тканях и клеточных линиях. Неоднократно сообщалось и о потере экспрессии *DAPK1* в отсутствие гиперметилирования его промотора, что указывает на существование дополнительных уровней регуляции *DAPK1* в опухолях, включая посттранскрипционную регуляцию *DAPK1*. В небольшом числе исследований сообщалось о гомозиготных и аллельных делециях, точечных мутациях и однонуклеотидных полиморфизмах в гене *DAPK1* [5, 6, 15].

Одним из таких дополнительных уровней регуляции может выступать взаимодействие микроРНК с 3'Нетранслируемой областью (3'НТО) мРНК гена-мишени [16]. МикроРНК представляет собой семейство высококонсервативных некодирующих РНК, длиной 19–25 нуклеотидов. Основная функция микроРНК — участие в регуляции экспрессии белоккодирующих генов на посттранскрипционном уровне [17]. По данным базы miRWalk мРНК гена *DAPK1* может являться мишенью для 300 микроРНК. Для многих из них показано влияние на экспрессию гена *DAPK1* при различных видах онкозаболеваний. Так, например, miR-103 и miR-107 связываются с 3'НТО мРНК гена *DAPK1* и подавляют экспрессию р*DAPK1*, тем самым инактивируя интегрин В1, что приводит к увеличению подвижности клеток и снижению адгезии клеток к матриксу при колоректальном раке [18]. В то же время, влияние ряда микроРНК

на изменение уровня экспрессии *DAPK1* при НМРЛ еще до конца не изучено, например miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 и др. Следует отметить, что данных о взаимодействии мРНК гена *DAPK1* с этими микроРНК при НМРЛ не выявлено.

Целью данной работы являлось исследование изменений уровня экспрессии и/или метилирования микроРНК и их гена-мишени *DAPK1* при немелкоклеточном раке легкого.

### Методика

Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по системе TNM в соответствии с классификацией RUSSCO. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с принципами Хельсинкской декларации ВМА. В **таблице** приведены обобщенные данные по клинико-патоморфологическим характеристикам 35 исследованных парных образцов НМРЛ.

Высокомолекулярную ДНК и РНК выделяли из ткани стандартными методами. Анализ уровня метилирования промоторного CpG-островка гена *DAPK1* проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе [19]. Олигонуклеотиды для анализа уровня метилирования гена *DAPK1* взяты из работы [20].

Поиск предположительно взаимодействующих пар микроРНК — мРНК гена мишени проводили на основе анализа данных интернет-ресурса miRWalk2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>).

*Анализ уровня экспрессии* мРНК гена *DAPK1* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I в составе набора qPCRmix-HS SYBR (5x) в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSYSTEM (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии miR-124-3p (ID: 001182), miR-129-5p (ID: 000590), miR-339-3p (ID: 002184), miR-375 (ID: 000564) анализировали с помощью TaqMan qPCR (TaqMan MicroRNA Assay; Applied Biosystems, США) и нормализовали по экспрессии RNU6 (ID: 001093). Олигонуклеотиды для анализа уровня экспрессии гена *DAPK1* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем при анализе экспрессии, взяты

из работы [20]. Все ПЦР повторяли трижды. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по  $\Delta\Delta Ct$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее, чем в 2 раза ( $|\Delta\Delta Ct| \leq 2$ ) рассматривали как отсутствие изменений [20].

**Статистический анализ.** Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ «IBM SPSS Statistics 22», который включал определение медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1–Q3). Для оценки статистической значимости различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили посредством расчета коэффициента корреляции Спирмена и уровня его значимости. Значение  $p < 0.05$  были приняты в качестве критериев статистической значимости.

### Результаты и обсуждение

В настоящей работе изучено влияние ряда механизмов эпигенетической регуляции экспрессии, затрагивающей изменение уровня мРНК гена *DAPK1* при

НМРЛ. К этим механизмам относится как метилирование промоторных CpG-островков самих генов, так и изменение уровня экспрессии миРНК, для которых эти гены являются мишенями.

Таким образом, методом количественной метил-специфичной ПЦР был проведен анализ изменения уровня метилирования гена *DAPK1* в опухолевой ткани НМРЛ и прилежащей к опухоли гистологически нормальной ткани легкого. Используя критерий Манна–Уитни для независимых выборок, было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования гена *DAPK1* в опухолевой ткани НМРЛ (рис. 2, А). Полученные нами результаты дополняют полученные ранее в международных исследованиях данные о характере метилирования данного гена при НМРЛ [21, 22].

Следует отметить, что изменение уровня метилирования генов лежит в основе прогрессии любой опухоли, в том числе и НМРЛ. Поэтому, нами был проведен анализ изменения уровня метилирования промоторного района гена *DAPK1* в образцах опухоли в зависимости от патоморфологических характеристик,

#### Клинико-патоморфологические параметры больных НМРЛ

#### Clinical and pathomorphological parameters of NSCLC patients

Клинико-патоморфологический параметр Clinical and pathomorphological parameter		n, (%)
Гистологический диагноз Histological diagnosis	Плоскоклеточный рак легкого Squamous cell lung cancer	16, (45.7)
	Аденокарцинома легкого Adenocarcinoma of the lung	19, (54.3)
Стадия опухолевого процесс Tumour stage	I	11, (31.4)
	II	8, (22.9)
	III	13, (37.1)
	IV	3, (8.6)
Степень дифференцировки Degree of differentiation	G1	2, (5.7)
	G2	15, (42.9)
	G3	18, (51.4)
Размер первичной опухоли Primary tumour size	T1	4, (11.4)
	T2	19, (54.3)
	T3	5, (14.3)
	T4	7, (20.0)
Лимфогенное метастазирование Lymphogenic metastasis	N0	12, (34.3)
	N1-3	23, (65.7)
Статус курильщика Smoking status	Курит Smokes	17, (48.6)
	Не курит Doesn't smoke	18, (51.4)

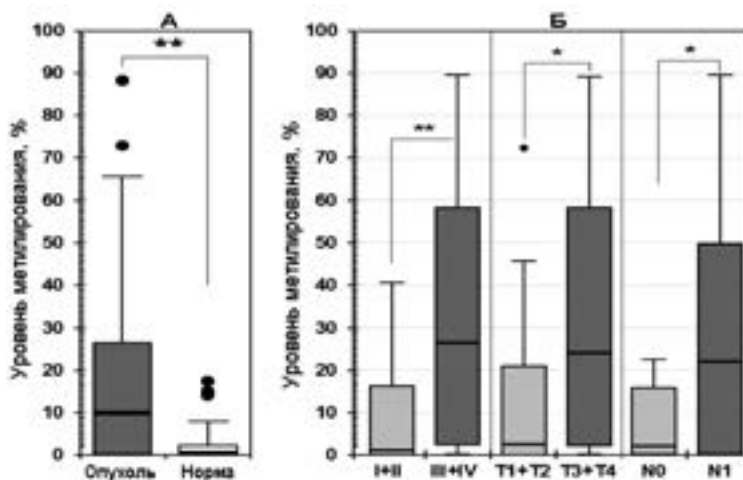
таких как клиническая стадия опухолевого процесса, степень дифференцировки клеток опухоли, размер опухоли, наличие или отсутствие лимфогенного метастазирования. Было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования гена в образцах полученных от пациентов с тяжелыми стадиями НМРЛ (III-IV стадии) по сравнению с образцами от пациентов с более ранними стадиями (I-II) легкими стадиями (рис. 2, Б). Также статистически значимо высокий уровень метилирования гена *DAPK1* был связан с увеличением размера опухоли (T3/T4 против T1/T2) и наличием лимфогенного метастазирования (N1 против N0) (рис. 2, Б). Что интересно, в ряде зарубежных исследований также отмечено увеличение уровня метилирования с прогрессией опухоли [23–25]. В частности, показано, что гиперметилирование промотора *DAPK1* коррелирует с лимфатическим метастазированием при раке желудка и плоскоклеточном раке ротоглотки [26, 27].

Далее методом ПЦР в реальном времени в образцах НМРЛ были исследованы профили экспрессии микроРНК miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 и мРНК их гена-мишени *DAPK1* (рис. 3). В результате было найдено статистически значимое снижение уровня экспрессии miR-375 у в опухолевых образцах НМРЛ по сравнению с парной гисто-

логически нормальной тканью. Для остальных изученных генов статистически значимых результатов получено не было.

С применением корреляционного анализа показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением уровня метилирования промоторного CpG-островка и уровнем экспрессии для гена *DAPK1* (рис. 4, А). Поэтому можно сказать, что гиперметилирование в опухоли является биологическим маркером изменения экспрессии этого гена. Следует подчеркнуть, что наши результаты согласуются как с данными мировых исследователей, так и нашими собственными, полученными для других видов онкологии [20, 28].

Хотя высокий уровень метилирования промоторных CpG-островков генов кодирующих белок часто признается основной причиной инактивации того или иного гена, часто белки, кодируемые этими генами, могут не экспрессироваться и при отсутствии метилирования в первичных тканях и клеточных линиях, что указывает на существование дополнительных уровней их регуляции в опухолях, включая посттранскрипционную регуляцию. Поэтому, нами было проведено сопоставление данных по изменению уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1* и 4-х миРНК (miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375), для кото-

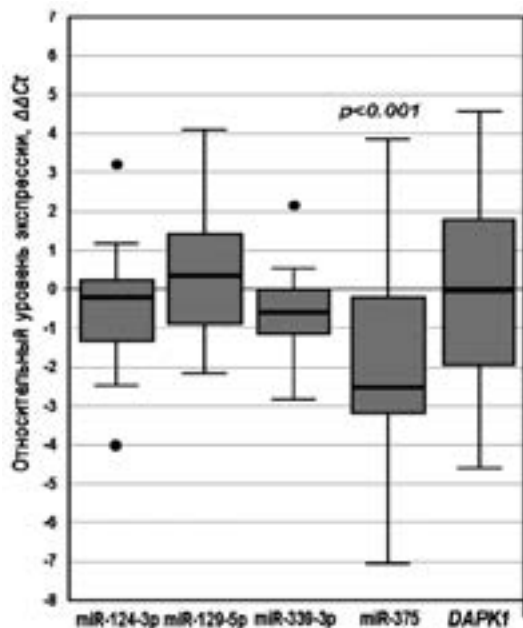


**Рис. 2.** Статус метилирования гена *DAPK1*: (А) в парных (опухоль/норма) образцах НМРЛ; (Б) связь с клинической стадией, размером опухоли, лимфогенным метастазированием при НМРЛ. Здесь и далее, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; верхняя и нижняя граница прямоугольников соответствуют Q1 и Q3. Линия внутри прямоугольника соответствует Me. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечена «ограда», расположенная на 1.5 межквартильных расстояний (Q1-Q3) от нижней и верхней границ коробки. Все точки за пределами «ограды» помечались как «вылетающие» наблюдения, или «выбросы».

**Fig. 2.** The methylation status of the *DAPK1* gene: (A) in paired (tumor/norm) NSCLC samples; (B) the relationship with the clinical stage, tumor size, lymphogenic metastasis in NSCLC. Here and further, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; the upper and lower bounds of the rectangles correspond to Q1 and Q3. The line inside the rectangle corresponds to Me. The lines above and below the rectangles mark the «fence» located at 1.5 interquartile distances (Q1-Q3) from the lower and upper borders of the box. All points outside the «fence» were marked as «outgoing» observations, or «outliers».

рых этот ген является потенциальным геном-мишенью. Данные о возможной взаимосвязи между миРНК и белоккодирующими генами были получены по результатам анализа базы miRWalk (<https://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>).

В результате анализа полученных данных и оценки их конкордантности, с помощью коэффициента корреляции Спирмена, были сформированы 2 пары миРНК – мРНК ген-мишень: miR-339-3p – DAPK1 ( $R_s = -0,476$ ,  $p = 0,004$ ); miR-375 – DAPK1 ( $R_s = -0,354$ ,  $p = 0,037$ ) (рис. 4, Б). Полученные нами результаты позволяют предполагать прямое воздействие миРНК на изменение уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1*, что согласуется с известным механизмом подавления экспрессии белоккодирующих генов под действием миРНК. В частности, в литературе при раке молочной железы для miR-191-5p отмечено взаимодействие с мРНК гена *DAPK1*, приводящее к инактивации гена и тем самым блокированию проведению сигналов «смерти клетки» и отключению митохондриального пути апоптоза. [29]. В другой работе, выполненной на образцах почечно-клеточного рака, экспрессия *DAPK1* была снижена из-за воздействия на нее miR-34a [30]. При восстановлении уровня экспрессии *DAPK1* происходило подавление пролиферации, миграции и инвазии клеток почечно-клеточного рака.

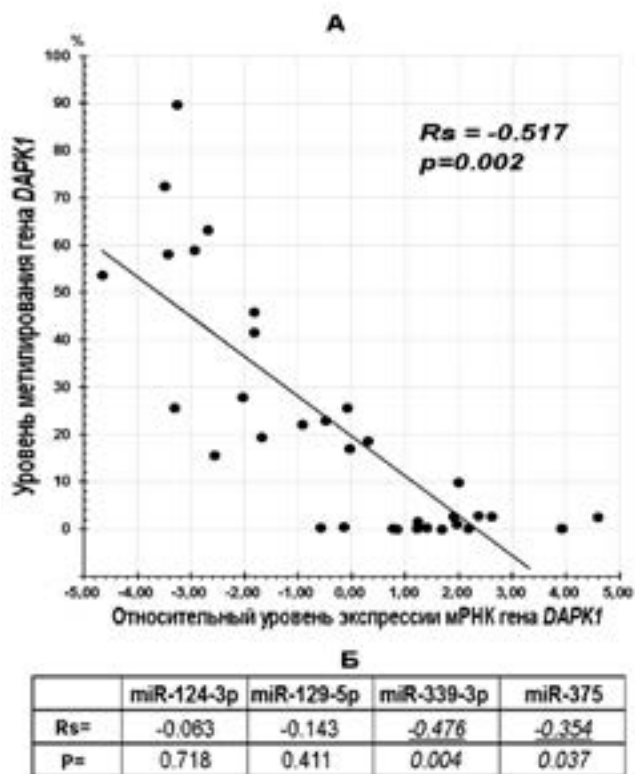


**Рис. 3.** Профиль экспрессии miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 и мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ, выраженный в значениях  $-\Delta\Delta C_t$ .

**Fig. 3.** Expression profile of miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 and mRNA of the *DAPK1* gene in NSCLC, expressed in values  $-\Delta\Delta C_t$ .

Следует подчеркнуть, что данных о взаимодействии miR-339-3p и miR-375 с мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ не выявлено (PubMed, апрель 2023). Однако, в ряде работ показано, что высокий уровень экспрессии miR-375 вносит существенный вклад в прогрессию рака легкого и показано ее взаимодействие с рядом генов-мишеней (*PAX6*, *RHOJ*, *IGF1R* и др.), которые играют важную роль при апоптозе, эпителиально-мезенхимальном переходе, миграции инвазии клеток [31]. Для миРНК miR-339 показана тесная связь изменения уровня экспрессии с инактивацией ферроптоза [32] при аденокарциноме легкого.

Таким образом, полученные нами взаимодействующие пары миРНК – мРНК ген-мишень, скорее всего с связаны с регуляцией процессов программируемой клеточной гибели, протекающими в нормальной и/или опухолевой клетке. Однако, эти результаты, требуют дополнительного подтверждения *in vitro* и *in vivo*.



**Рис. 4.** Корреляционный анализ. (А) Связь между экспрессией мРНК и метилированием ДНК для гена *DAPK1*; (Б) Потенциально-взаимодействующие пары миРНК – ген-мишень при НМРЛ. Коэффициент корреляции Спирмена –  $R_s$  и  $p$  – значение (двустороннее) корреляции.

**Fig. 4.** Correlation analysis. (A) The relationship between mRNA expression and DNA methylation for the *DAPK1* gene; (B) Potentially interacting miRNA-target gene pairs in NSCLC. Spearman's correlation coefficient is  $R_s$  and  $p$  is the (two-way) correlation value.

### Заключение

Известно, что DAPK1 играет важную роль в регуляции роста и гибели клеток, что имеет решающее значение для выживания как пролиферирующих, так и дифференцированных тканей. Нарушение регуляции экспрессии и/или активности DAPK1 может вызывать или способствовать развитию рака, в том числе и НМРЛ. Гиперметилирование или инактивация DAPK1, посредством изменения уровня экспрессии микроРНК, провоцируют рак через антиапоптотические пути, и эффективная активация DAPK1, нацеленная только на раковые клетки, может стать мощной противораковой терапией.

В настоящем исследовании показано, что метилирование промоторного CpG-островка гена *DAPK1* вносит существенный вклад в снижение уровня его экспрессии, что приводит к прогрессии НМРЛ, что также подтверждается высоким уровнем метилирования на поздних стадиях онкологического процесса. Следует отметить, что процесс регуляции уровня экспрессии данного гена также связан с изменением уровня экспрессии miR-339-3p и miR-375, для которых ген *DAPK1* является геном-мишенью.

Таким образом, выявленные нами особенности представляются важными для понимания патогенеза НМРЛ; а исследование уровня метилирования и/или экспрессии может найти применение при разработке персонализированных подходов к диагностике, прогнозу у больных НМРЛ.

Однако разработка модуляторов DAPK1 все еще находится на ранних стадиях и может быть сложной из-за специфичности, проблем с селективностью, нецелевых эффектов, побочных эффектов. Необходимы дополнительные исследования, чтобы лучше понять, как DAPK1 регулируется в определенных тканях и при онкологических заболеваниях и как DAPK1 взаимодействует со своими партнерами по связыванию.

*Авторы благодарят Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина за сбор и клинко-гистологическую характеристику образцов НМРЛ.*

### Литература

(п.п. 1; 3-32 см. References)

2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022.

### References

1. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2022; 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708
2. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. *Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2021 gody zabolevaemost i smertnost]. Moscow: MNIIOI named. P.A. Herzen – a branch of the Federal State Budgetary Institution “SMRC Radiology” of the Ministry of Health of Russia. 2022.
3. Morris L.G., Chan T.A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer.* 2015; 121(9): 1357-68. doi: 10.1002/cncr.29140
4. Yang S., Huang Y., Zhao Q. Epigenetic Alterations and Inflammation as Emerging Use for the Advancement of Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2022; 13: 878740. doi: 10.3389/fimmu.2022.878740
5. Chen H.Y., Lee Y.R., Chen R.H. The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis. *Apoptosis.* 2014; 19(2): 364-70. doi: 10.1007/s10495-013-0923-6
6. Michie A.M., McCaig A.M., Nakagawa R., Vukovic M. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *FEBS J.* 2010; 277(1): 74-80. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07414.x
7. Chen D., Zhou X.Z., Lee T.H. Death-Associated Protein Kinase 1 as a Promising Drug Target in Cancer and Alzheimer’s Disease. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2019; 14(2): 144-57. doi: 10.2174/1574892814666181218170257
8. Bialik S., Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75: 189-210. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142615
9. Singh P., Ravanan P., Talwar P. Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy. *Front Mol Neurosci.* 2016; 23; 9: 46. doi: 10.3389/fnmol.2016.00046
10. Tian X., Shi Y., Liu N., Yan Y., Li T., Hua P., et al. Upregulation of DAPK contributes to homocysteine-induced endothelial apoptosis via the modulation of Bcl2/Bax and activation of caspase 3. *Mol Med Rep.* 2016; 14(5): 4173-79. doi: 10.3892/mmr.2016.5733
11. Kuo J.C., Wang W.J., Yao C.C., Wu P.R., Chen R.H. The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway. *J Cell Biol.* 2006; 13; 172(4): 619-31. doi: 10.1083/jcb.200505138
12. Cai F., Xiao X., Niu X., Zhong Y. Association between promoter methylation of DAPK gene and HNSCC: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(3): e0173194. doi: 10.1371/journal.pone.0173194
13. Steinmann S., Kunze P., Hampel C., Eckstein M., Bertram Bramsen J., Muenzner J.K., et al. DAPK1 loss triggers tumor invasion in colorectal tumor cells. *Cell Death Dis.* 2019; 10(12): 895. doi: 10.1038/s41419-019-2122-z
14. Inbal B., Cohen O., Polak-Charcon S., Kopolovic J., Vadai E., Eisenbach L., Kimchi A. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature.* 1997; 390(6656): 180-4. doi: 10.1038/36599
15. Benderska N., Schneider-Stock R. Transcription control of DAPK. *Apoptosis.* 2014; 19(2): 298-305. doi: 10.1007/s10495-013-0931-6
16. Michlewski G., Cáceres J.F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019; 25(1): 1-16. doi: 10.1261/rna.068692.118



17. Wang Y., Luo Z., Wang Z., You M., Xie S., Peng Y., et al. Effect of Curcumin-Loaded Nanoparticles on Mitochondrial Dysfunctions of Breast Cancer Cells. *J. Nanoparticle Res.* 2018; 20(10): 283-94. doi:10.1007/s11051-018-4382-4
18. Chen H.Y., Lin Y.M., Chung H.C., Lang Y.D., Lin C.J., Huang J., et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. *Cancer Res.* 2012; 72(14): 3631-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0667
19. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., 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; 23(3): 1300. doi: 10.3390/ijms23031300
20. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene.* 2017; 604: 1-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018
21. Chen Z., Fan Y., Liu X., Shang X., Qi K., Zhang S. Clinicopathological significance of DAPK gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2022; 37(1): 47-57. doi: 10.1177/17246008211067552
22. Daniunaite K., Sestokaite A., Kubiliute R., Stuopelyte K., Kettunen E., Husgafvel-Pursiainen K., et al. S. Frequent DNA methylation changes in cancerous and noncancerous lung tissues from smokers with non-small cell lung cancer. *Mutagenesis.* 2020; geaa022. doi: 10.1093/mutage/geaa022
23. Ji M., Guan H., Gao C., Shi B., Hou P. Highly frequent promoter methylation and PIK3CA amplification in non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC Cancer.* 2011; 11: 147. doi: 10.1186/1471-2407-11-147
24. Ji M., Zhang Y., Shi B., Hou P. Association of promoter methylation with histologic type and pleural indentation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Diagn Pathol.* 2011; 6: 48. doi: 10.1186/1746-1596-6-48
25. Yang X.Y., Zhang J., Yu X.L., Zheng G.F., Zhao F., Jia X.J. Death-associated protein kinase promoter methylation correlates with clinicopathological and prognostic features in nonsmall cell lung cancer patients: A cohort study. *J Cancer Res Ther.* 2018; 14(Supplement): S65-S71. doi: 10.4103/0973-1482.158197
26. Melchers L.J., Clausen M.J., Mastik M.F., Slagter-Menkema L., van der Wal J.E., Wisman G.B., et al. Identification of methylation markers for the prediction of nodal metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Epigenetics.* 2015; 10(9): 850-60. doi: 10.1080/15592294.2015.1075689
27. Jia W., Yu T., Cao X., An Q., Yang H. Clinical effect of DAPK promoter methylation in gastric cancer: A systematic meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(43): e5040. doi: 10.1097/MD.0000000000005040
28. Li Y., Zhu M., Zhang X., Cheng D., Ma X. Clinical significance of DAPK promoter hypermethylation in lung cancer: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 1785-96. doi: 10.2147/DDDT.S78012
29. Majed S.O. RNA sequencing-based total RNA profiling: The Oncogenic MiR-191 identification as a novel biomarker for breast cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2022; 68(1): 177-91. doi: 10.14715/cmb/2022.68.1.22
30. Jing Z.F., Bi J.B., Li Z., Liu X., Li J., Zhu Y., et al. Inhibition of miR-34a-5p can rescue disruption of the p53-DAPK axis to suppress progression of clear cell renal cell carcinoma. *Mol Oncol.* 2019; 13(10): 2079-97. doi: 10.1002/1878-0261.12545
31. Gan T.Q., Chen W.J., Qin H., Huang S.N., Yang L.H., Fang Y.Y., et al. Clinical value and prospective pathway signaling of MicroRNA-375 in lung adenocarcinoma: a study based on the cancer genome atlas (TCGA), gene expression omnibus (GEO) and bioinformatics analysis. *Med Sci Monit.* 2017; 23: 2453-64. doi: 10.12659/msm.901460
32. Zhang N., Huang J., Xu M., Wang Y. LncRNA T-UCR Uc.339/miR-339/SLC7A11 Axis Regulates the Metastasis of Ferroptosis-Induced Lung Adenocarcinoma. *J Cancer.* 2022; 13(6): 1945-57. doi: 10.7150/jca.65017

**Сведения об авторах:**

**Пronina Ирина Валерьевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Губенко Марина Сергеевна**, мл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Бурденный Алексей Михайлович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; науч. сотр., ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля» РАН;

**Казубская Татьяна Павловна**, доктор мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр., лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

**Брага Элеонора Александровна**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., и.о. зав. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр., «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»;

**Логинов Виталий Игоревич**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр., «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».