

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092+575:599

Филиппова Е.А.¹, Лукина С.С.¹, Бурдённый А.М.^{1,2}, Пронина И.В.^{1,3},
Логинов В.И.^{1,4}, Аржанухина Н.А.⁵, Казубская Т.П.⁵, Брага Э.А.^{1,4}

Ко-метилование в согласованной регуляции группы генов апоптоза при раке молочной железы

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН,
119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

³ФГБОУ «Государственный университет просвещения»,
141014, Московская обл., Мытищи, Россия, ул. Веры Волошиной, д. 24;

⁴ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова,
115478, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23

Актуальность. Согласно последним данным мировой статистики, рак молочной железы (РМЖ) опередил рак легких по заболеваемости среди женщин. Эпигенетические изменения возникают на самых ранних этапах трансформации нормальной клетки в опухоль и позволяют заранее предсказать возможность возникновения РМЖ, что отражает преимущества эпигенетики в предупреждении предраковых заболеваний и ранней диагностике. Кроме того, эпигенетические модификации обратимы, а генетическая регуляция необратима, поэтому для лечения РМЖ более привлекательным является разработка препаратов, направленных на обратимые процессы.

Цель исследования – определение роли aberrантно метилирования генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* в прогрессии РМЖ и роли ко-метилования и ко-экспрессии в совместной регуляции и функциях.

Методика. Образцы опухолей молочной железы собраны и клинически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Высокмолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* проводился с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной МС-ПЦР в реальном времени готовой реакционной смесью qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Статистический анализ уровней экспрессии выполнен в программной среде R с применением непараметрического U теста Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполняли с использованием метода ранговой корреляции Спирмена и рассчитывали уровень его значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные об экспрессии и метилировании исследуемых генов при РМЖ проанализированы также по базам данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>) и GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), о процессах и сигнальных путях – по базе ncPath (<http://ncpath.pianlab.cn/#/Home>).

Результаты. Определены aberrантно метилированные гены *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1* при РМЖ. Показано значимое ($p < 0,05$) увеличение уровня метилирования на более поздней стадии (III) по сравнению с более ранними стадиями (I-II) РМЖ и с увеличением размера опухоли для генов *APAF1*, *BAK1*, *DAPK1*, а также при наличии метастазов в лимфатических узлах для генов *APAF1* и *BIM*. Впервые определены ко-метилируемые гены системы апоптоза при РМЖ: *BCL2* – *BIM*, *APAF1* – *DAPK1*, *APAF1* – *BIM*, *APAF1* – *BCL2* ($r_{\{0,30-0,46\}}$; $p < 0,05$).

Заключение. Изучение молекулярных механизмов развития и прогрессии РМЖ, а также новое представление о паттернах метилирования генов системы апоптоза приблизит к открытию новых маркеров и перспективных мишеней для таргетной терапии РМЖ.

Ключевые слова: белоккодирующие гены; апоптоз; метилирование ДНК; рак молочной железы

Для цитирования: Филиппова Е.А., Лукина С.С., Бурдённый А.М., Пронина И.В., Логинов В.И., Аржанухина Н.А., Казубская Т.П., Брага Э.А. Ко-метилование в согласованной регуляции группы генов апоптоза при раке молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(3): 4-14.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.4-14

Участие авторов: Филиппова Е.А. – концепция и структура статьи, статистическая обработка полученных данных; Лукина С.С., Пронина И.В. – ответственные за экспериментальные данные; Бурденный А.М. – обработка полученных данных; Логинов В.И. – подготовка иллюстративного материала; Аржанухина Н.А. – сбор клинических образцов; Казубская Т.П. – сбор клинических образцов; Брага Э.А. – участие в обсуждении и редактировании статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: *Филиппова Елена Александровна*, e-mail: p.lenyxa@yandex.ru;
Бурденный Алексей Михайлович, e-mail: burdennyuy@gmail.com

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.05.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

**Filippova E.A.¹, Lukina S.S.¹, Burdennyu A.M.^{1,2}, Pronina I.V.^{1,3},
Loginov V.I.^{1,4}, Arzhanukhina N.A.⁵, Kazubskaya T.P.⁵, Braga E.A.^{1,4}**

Co-methylation in the concerted regulation of a group of apoptotic genes in breast cancer

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8 Baltijskaya Str., Moscow, 125315, Russian Federation;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS,
4 Kosygin st., Moscow, 119334, Russian Federation;

³State University of Education,
24 Very Voloshinoy str., Mytishchi, Moscow oblast, 141014, Russian Federation;

⁴Research Centre for Medical Genetics,
1 Moskvoreche str., Moscow, 115522, Russian Federation;

⁵N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology The Ministry of Health of Russia,
23 Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russian Federation

Background. According to the latest global statistics, breast cancer (BC) has surpassed lung cancer in the incidence among women. Epigenetic changes at the earliest stages of normal cell transformation into tumor cells allow us to predict the possibility of breast cancer in advance, which reflects the advantages of epigenetics in preventing precancerous diseases and early diagnosis. In addition, epigenetic modifications are reversible, while the genetic regulation is irreversible, so the development of drugs aimed at reversible processes is more attractive for the treatment of BC.

The aim of the study was to determine the role of aberrant methylation of the apoptosis-related genes, APAF1, BAK1, BAX, BCL2, BIM, and DAPK1, in the BC progression and the role of co-methylation and co-expression in the co-operative regulation and functions.

Methods. Breast tumor samples were collected and clinically characterized at the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. High-molecular DNA was isolated from the tissue using a standard method. The level of methylation of the APAF1, BAK1, BAX, BCL2, BIM, and DAPK1 genes was assessed by bisulfite DNA conversion and quantitative real-time MS-PCR with the ready-made reaction mixture qPCRmix-HS SYBR (Eurogen). Statistical analysis of the expression was performed in the R software environment using the nonparametric Mann-Whitney U test. Correlation analysis was performed with the Spearman rank correlation test, and the significance level was calculated. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Expression and methylation parameters of the studied genes were also analyzed in BC using the MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>) and GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) databases, and data on processes and signaling pathways were analyzed using the ncPath database (<http://ncpath.pianlab.cn/#/Home>).

Results. Aberrantly methylated APAF1, BAK1, BAX, BIM, DAPK1 genes were identified in BC. A significant ($p < 0.05$) increase in the methylation level was shown at a later stage (III) compared with earlier stages (I-II) of BC; with larger tumor sizes for the APAF1, BAK1, DAPK1 genes; and in the presence of metastases in the lymph nodes for the APAF1 and BIM genes. For the first time, co-methylated apoptosis-related genes were identified in BC: BCL2 – BIM, APAF1 – DAPK1, APAF1 – BIM, and APAF1 – BCL2 ($rs\{0.30 - 0.46\}$; $p < 0.05$).

Conclusion. Studying molecular mechanisms of BC development and progression, as well as a new insight into the methylation patterns of apoptosis-related genes will bring us closer to the discovery of new markers and promising targets for targeted therapy of BC.

Keywords: protein-coding genes; apoptosis; DNA methylation; breast cancer

For citation: Filippova E.A., Lukina S.S., Burdennyu A.M., Pronina I.V., Loginov V.I., Arzhanukhina N.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A. Co-methylation in the coordinated regulation of a group of apoptosis genes in breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 4-14. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.4-14

Contribution of the authors: Filippova E.A. – concept and structure of the article and statistical processing of the obtained data; Lukina S.S., Pronina I.V. – responsible for the experimental data; Burdenny A.M. – processing of the obtained data; Loginov V.I. – preparation of illustrative material; Arzhanukhina N.A. – collection of clinical samples; Kazubskaya T.P. – collection of clinical samples; Braga E.A. – participation in the discussion and editing of the article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Filippova Elena Aleksandrovna*, e-mail: p.lenyxa@yandex.ru;
Burdenny Alexey Mikhailovich, e-mail: burdenny@gmail.com

Information about the authors:

Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Lukina S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>

Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Arzhanukhina N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1928-5010>

Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>

Braga E.A., <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 22-75-00132).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors thank the staff of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology for collecting and clinical and histologically characterizing breast cancer samples.

Received 07.05.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Согласно данным мировой статистики, рак молочной железы (РМЖ) опередил рак легких по заболеваемости среди женщин в мире и в России [1]. Число новых случаев РМЖ за 2022 г. во всем мире составляет 2,3 млн, что соответствует 23,8% всех новых случаев рака у женщин, а смертность от РМЖ достигла 700 тыс случаев за 2022 г. [1]. Современная терапия больных РМЖ включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, гормональную терапию, химиотерапию и таргетную терапию, но у 30% больных по-прежнему наблюдается рецидив опухоли или отдаленные метастазы [2]. Ввиду чего, изучение молекулярных механизмов РМЖ и поиск новых потенциальных терапевтических мишеней представляется крайне актуальной задачей.

Гены системы апоптоза играют ключевую роль в функционировании клетки, корректная работа системы регуляции генов апоптоза отвечает за своевременное распознавание «ошибок» в работе клетки с последующим ее самоуничтожением. Однако, в силу различных aberrаций происходит нарушение баланса и функций проапоптозных и антиапоптозных генов, что приводит к нарушению работы отлаженной системы программируемой клеточной гибели. Одним из таких факторов выступает метилирование промоторных CpG-островков генов системы апоптоза, что приводит к aberrантной экспрессии генов апоптоза и, как следствие, к возникновению и прогрессии рака.

Рак является многофакторным заболеванием, сочетающим в себе генетические и эпигенетические нару-

шения. Эпигенетические изменения возникают на самых ранних этапах трансформации нормальной клетки в опухолевую и позволяют заранее предсказать возможность возникновения РМЖ, что отражает преимущества эпигенетики в предупреждении предраковых заболеваний и ранней диагностике. Кроме того, эпигенетические модификации обратимы, а генетическая регуляция необратима, поэтому для лечения РМЖ более привлекательным является разработка препаратов, направленных на обратимые процессы [3]. Предлагается использование ферментов, связанных с эпигенетической регуляцией, в качестве мишеней для изменения эпигенетической динамики и восстановления общей экспрессии генов в составе комплексной терапии РМЖ [4]. Примечательно, что эпигенетические модификации сложны и разнообразны, и имеют синергетический эффект.

Гиперметилованию чаще всего подвержены гены-супрессоры опухолей, однако эта модификация найдена также для генов репарации ДНК, апоптоза, регуляции клеточного цикла, роста клеток, гомеостаза и адгезии [5–7]. Считается, что статус метилирования ДНК может иметь значение как в качестве диагностического, так и в качестве прогностического маркера, включая ответ на терапию. К важным регуляторам апоптоза относятся Death-associated protein kinase 1 (DAPK1) и Apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), об инактивации которых путем гиперметилирования их генов сообщено при разных типах рака. Гиперметилование гена *DAPK1* показано при раке желудка и шейки матки [8, 9]. Отмечается,

что гиперметилирование гена *APAF1* может способствовать прогрессированию аденокарциномы поджелудочной железы посредством влияния на протекание периневральной инвазии [10].

Ранее нами были получены данные о гиперметилировании пяти генов системы апоптоза *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM/BCL2L11*, *DAPK1* [11, 12] при РМЖ и показана их значимость для диагностики РМЖ.

Цель работы – определение роли aberrантного метилирования группы генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* в прогрессии РМЖ и роли ко-метилирования и ко-экспрессии в совместной регуляции и функциях.

Методика

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 [13]. В работе использованы 50 образцов РМЖ (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 [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°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора Tissue Ruptor II (QIAGEN, Германия).

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани 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 использованием электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда с известной концентрацией.

Уровень метилирования ДНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ), как описано в работах [11, 12]. 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). Все олигонуклеотиды подобраны по программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* приведены в таблице 2. Для контрольного локуса АСТВ1 использованы олигонуклеотиды из работы [15]. 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»).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических про-

Таблица 1/Table 1

Клинико-патоморфологические параметры 50 использованных образцов РМЖ

Clinical and pathomorphological parameters of 50 breast cancer samples used

Параметр	Количество	
Стадия опухолевого процесса	Ранние стадии (I + II)	44
	III стадия	6
Размер первичной опухоли	T1	14
	T2	29
	T3	3
	T4	4
Лимфогенное метастазирование	Есть	21
	Нет	29

грамм 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. Корреляционный анализ проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена с поправкой на множественные сравнения Беньямини–Хохберга.

Данные об экспрессии и метилировании исследуемых генов при РМЖ взяты также из баз данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>) и GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), о процессах

и сигнальных путях – из базы ncPath (<http://ncpath.pianlab.cn/#/Home>).

Результаты и обсуждение

Гиперметилирование 6 генов апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* и связь с прогрессией РМЖ. С применением биоинформатического анализа базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.genome.jp/kegg/>) нами отображены 6 ключевых генов митохондриального пути апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*. Методом МС-ПЦР показано ($p < 0,05$) значимое увеличение уровня метилирования для 5 генов *APAF1*, *BAK1*,

Таблица 2/ Table 2

Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры количественной МС-ПЦР

Primer nucleotide sequences and qMS-PCR parameters

Ген днРНК	Последовательности олигонуклеотидов ^a , 5'→3'	$T_{отж}$, °C	Размер ампликона, п.н.
<i>APAF1</i>	MF: TTTTGAGGTTTAGTTACGTTTCGTTCCGC	60	222
	MR: CGTCCACTCGCTACCTCTTCTCTC		
	UF: AGTTTGGTATTGGTGGGAATGTGGTG	60	259
	UR: AACAAATCACATCCACTCACTACCTCTTCTT		
<i>BAK1</i>	MF: GTCGGTTTGTGCGTTTGTATTC	60	233
	MR: AAATCCCGAAAACTAACGACTACTACTCC		
	UF: TTATTTTATAGGTTGTGGTTTGTGT	60	181
	UR: AACATCAATACATTCCCAACAT		
<i>BAX</i>	MF: GATGTTTATTGGATAGTTACGTGACGGGA	60	115
	MR: ACGTAACCGCCCCGAAAATA		
	UF: GTTGATGGTGTTATTGTTGGTATTATTG	58	183
	UR: AATCACATAAAAACCCCACTAACATACA		
<i>BCL2</i>	MF: GAAGTCGTCGTCGGTTTG	60	182
	MR: CCCGACCCGAACATCG		
	UF: TTGTTGTTGGTTTGGTGGA	60	163
	UR: CCCACACCAAACATCTTCTC		
<i>BIM</i>	MF: TTCGGTAAATAATGGGGTCGGAGTAG	60	134
	MR: CGAATAAATCAAAAACCTCCAACGACTCTA		
	UF: AATAATGGGGTTGGAGTAGGGAATGTG	60	128
	UR: TCAAATAAATCAAAAACCTCCAACAACCTCT		
<i>DAPK1</i>	MF: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	62	98
	MR: CCCTCCCAAACGCCGA		
	UF: GGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	62	106
	UR: CAAATCCCTCCCAAACACCAA		

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

Note. MF/UF – forward primers to methylated/unmethylated allele, MR/UR – reverse primers to methylated/unmethylated allele.

BAX, *BIM*, *DAPK1* в опухоли по сравнению с нормальной тканью молочной железы (рис. 1). Гиперметилирование гена *BCL2* установлено нами ранее [11].

Полученные экспериментально результаты по гиперметилированию генов были сопоставлены с данными из базы данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>), которая содержит в себе информацию о 724 метилированных генах-биомаркерах из опубликованных статей в PubMed, а также данных полногеномного секвенирования метилирования ДНК (WGBS). Данные по гиперметилированию/деметилированию гена *BAX* и *BCL2* в базе MethMarkerDB не представлены. На рисунке 2 приведены данные об aberrантном метилировании 4 генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BIM*, *DAPK1* в образцах РМЖ ($p < 0,01$). Таким образом, полученные нами результаты о гиперметилировании 4 генов системы апоптоза экспериментально согласуются с данными биоинформатического анализа базы MethMarkerDB.

Проведен анализ изменений уровня метилирования 6 генов апоптоза (*APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*) в зависимости от клинко-патоморфологических показателей прогрессии РМЖ. Показано значи-

мое ($p < 0,05$) увеличение уровня метилирования на более поздней стадии (III) по сравнению с более ранними стадиями (I-II) РМЖ (рис. 3, А), и с увеличением размера опухоли (T_3 - T_4) по сравнению с размером опухоли T_1 - T_2 (рис. 3, Б) для генов *APAF1*, *BAK1*, *DAPK1*. Увеличение уровня метилирования генов *APAF1* и *BIM* отмечено ($p < 0,05$) при наличии метастазов в лимфатических узлах: N_0 против N_1 - N_3 (рис. 3, В).

Таким образом, выявлена связь метилирования генов с более поздней стадией РМЖ, с размером опухолей и наличием лимфогенного метастазирования, что может быть использовано для прогноза течения заболевания.

Ко-метилирование как маркер совместной регуляции группы генов апоптоза и совместного участия в процессах. Апоптоз представляет сложный комплексный процесс, включающий множество этапов и процессов, протекающих параллельно; апоптоз основан на активации отдельных сигнальных путей, регуляция которых нарушена в злокачественных опухолях [16]. Изучение одного или нескольких апоптотических компонентов, экспрессия которых изменяется и влияет на канцерогенез, может помочь отсле-

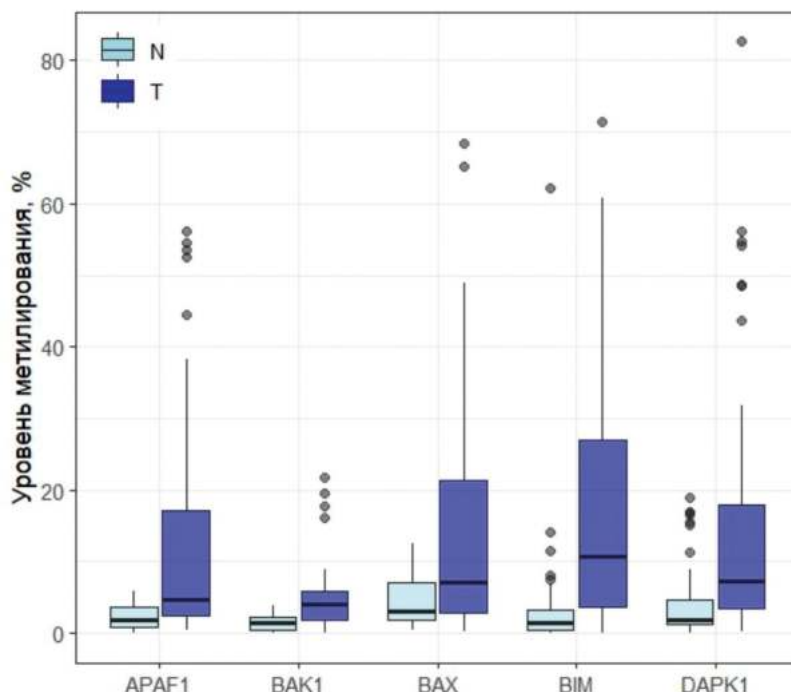


Рис. 1. Уровень метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1* в 50 парных образцах опухолей молочной железы и парных к ним нормальных тканях.

Fig. 1. Methylation level of the *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1* genes in 50 paired samples of breast tumors and paired normal tissues.

живать прогрессирование заболевания. Множество работ сообщают об использовании различных апоптотических компонентов в качестве маркеров прогноза и прогнозирования при различных типах рака человека [16]. Детальное исследование роли генов системы апоптоза, их регуляции и функции остаётся значимой задачей, тем более что показано диагностическое и прогностическое значение уровней

экспрессии и метилирования для ряда ключевых генов системы апоптоза, таких как *APAF1*, *BAX*, *BIM*/*BCL2L11*, *DAPK1* [12].

Сети совместной экспрессии генов используют для связывания генов с неизвестной функцией с биологическими процессами [17]. Нами поставлена задача выявления возможного ко-метилирования для группы генов системы апоптоза, что важно для понимания

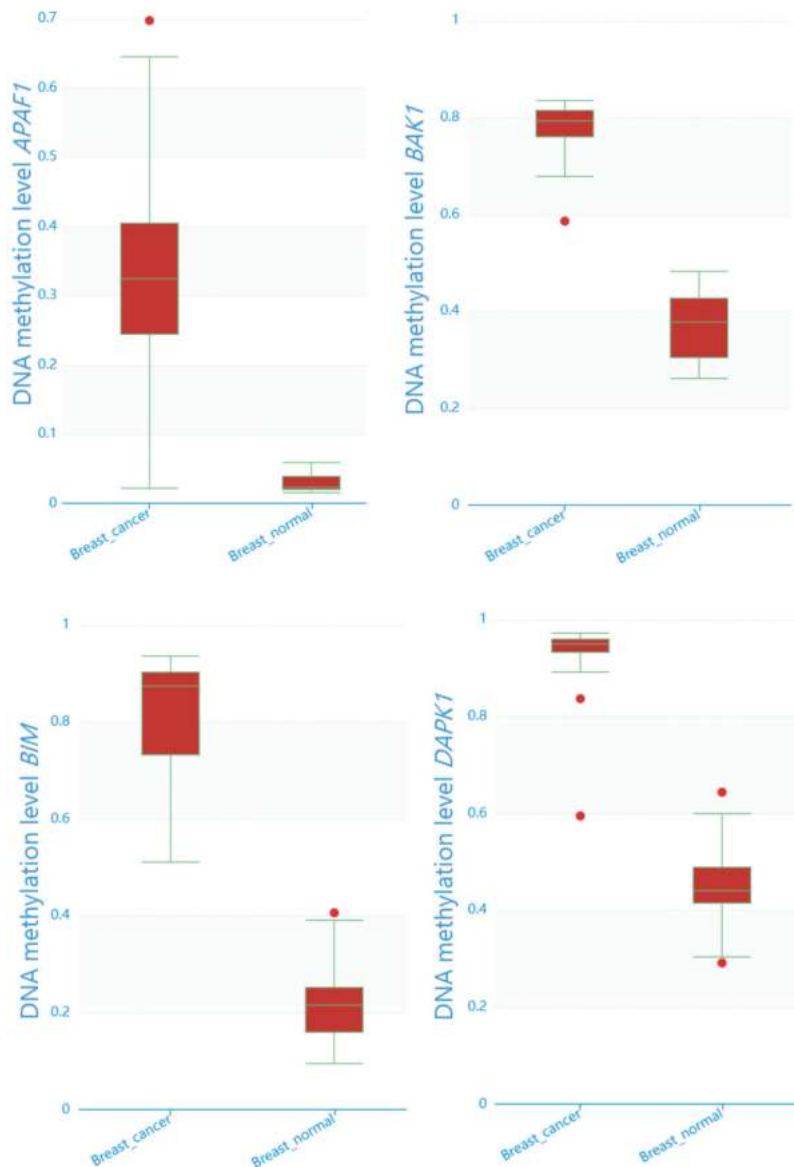


Рис. 2. Уровень метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *BIM*, *DAPK1* в образцах опухолей молочной железы и нормальных тканях молочной железы по данным из базы данных MethMarkerDB.

Fig. 2. Methylation level of *APAF1*, *BAK1*, *BIM*, *DAPK1* genes in breast tumor samples and normal breast tissues according to data from the MethMarkerDB database.

их регуляции и функционирования в процессах и сигнальных путях в системе апоптоза.

Методом статистического анализа с применением коэффициента корреляции Спирмена с поправкой на множественные сравнения Беньямини–Хохберга установили умеренные и высокие статистически значимые положительные корреляции относительного уровня метилирования для 4 пар белоккодирующих генов: *BCL2 – BIM*, *APAF1 – DAPK1*, *APAF1 – BIM*, *APAF1 – BCL2* ($r_s\{0,30-0,46\}$; $p<0,05$) (табл. 3).

На рисунке 4 приведена корреляционная матрица, наглядно отражающая ко-метилование 6 белок-кодирующих генов системы апоптоза при РМЖ.

Как видно из рис. 4, наиболее значимое ко-метилование проявили пары: *APAF1 – BCL2*, *APAF1 – BIM*, *BCL2 – BIM* ($r_s>0,3$, $p<0,01$), и несколько слабее ($r_s>0,2$, $p<0,05$): *APAF1 – DAPK1* и *BAX – DAPK1*.

Полученные данные о ко-метиловании этой группы генов позволяют предположить их согласо-

ванную регуляцию. Для подтверждения согласованной регуляции требовалось проверить наличие корреляций между уровнями экспрессии. Для этого мы провели анализ базы данных GEPIA 2.0, в которой содержатся данные об экспрессии генов из библиотек TCGA для 1085 образцов РМЖ и 112 образцов нормальной ткани (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). По результатам анализа выявили умеренные и высокие положительные корреляции экспрессии в следующих парах: *APAF1 – BCL2*, *APAF1 – BIM*, *APAF1 – DAPK1*, *BCL2 – BIM*. Коэффициент корреляции Спирмена и p-value для ко-экспрессирующихся пар приведены на рисунке 5. Таким образом, для 4 пар генов из 5, данные по ко-метилованию, полученные нами экспериментально, согласуются с данными по ко-экспрессии, полученные путем биоинформатического анализа базы GEPIA2.0.

Ко-метилование и ко-экспрессия, показанные для 4 пар генов, означают их совместную регуляцию

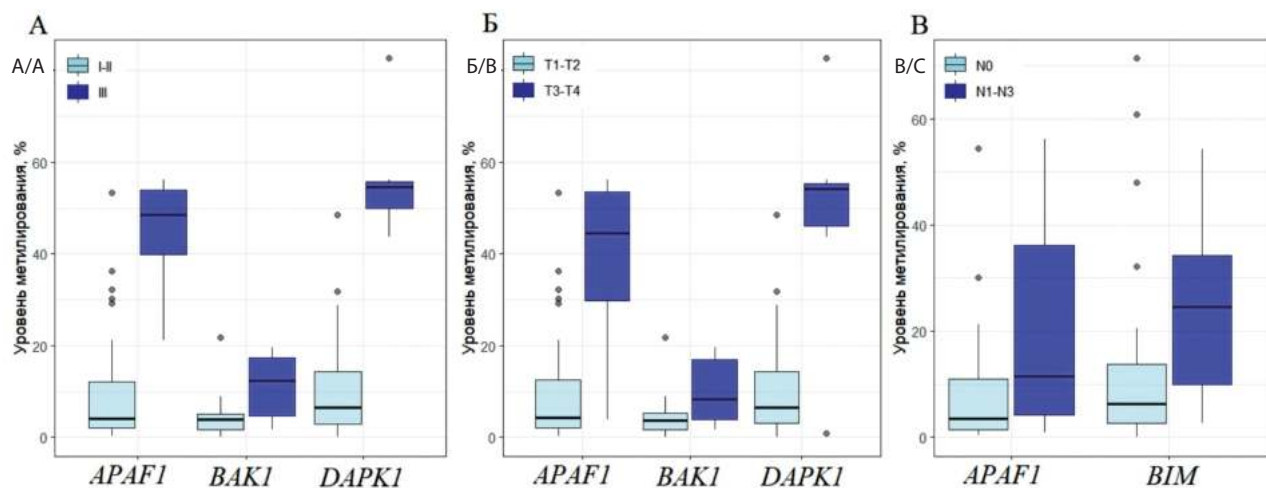


Рис. 3. Уровень метилирования генов А) в образцах опухолей молочной железы на поздней стадии РМЖ (III) по сравнению с ранними стадиями РМЖ (I-II); Б) в образцах опухолей молочной железы с размером опухоли T₃-T₄ по сравнению с T₁-T₂; В) в образцах опухолей молочной железы с метастазами (N₁-N₃) и без метастазов (N₀).

Fig. 3. Level of gene methylation A) in breast tumor samples at late stages of breast cancer (III) compared with early stages of breast cancer (I-II); B) in breast tumor samples with tumor size T₃-T₄ compared to T₁-T₂; B) in samples of breast tumors with metastases (N₁-N₃) and without metastases (N₀).

Таблица 3/ Table 3

Значения коэффициента корреляции Спирмена и уровня статистической значимости (p) для ко-метилованных генов

Spearman correlation coefficient and statistical significance level (p) values for co-methylated genes

БКГ	BCL2	APAF1	APAF1	APAF1
	BIM	DAPK1	BIM	BCL2
r_s	0.35	0.3	0.38	0.46
p	0.01	0.04	<0.01	<0.01

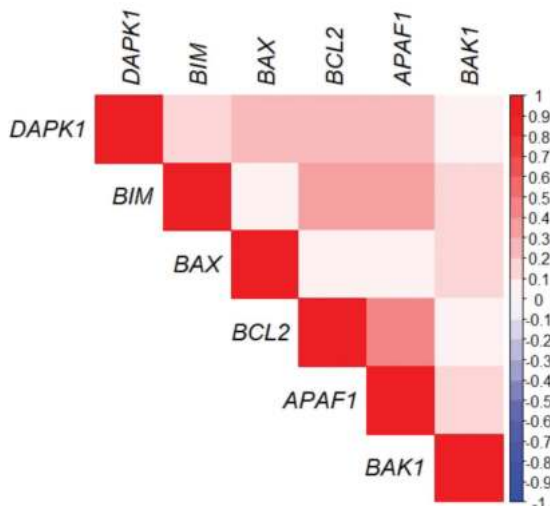


Рис. 4. Корреляционная матрица степени корреляции между уровнями метилирования 6 генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*. Красным цветом показаны положительные корреляции; интенсивность цвета эквивалентна коэффициенту корреляции Спирмена.

Fig. 4. Corplot of the degree of correlation between the methylation levels of 6 genes *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*. Positive correlations are shown in red; color intensity is equivalent to Spearman's correlation coefficient.

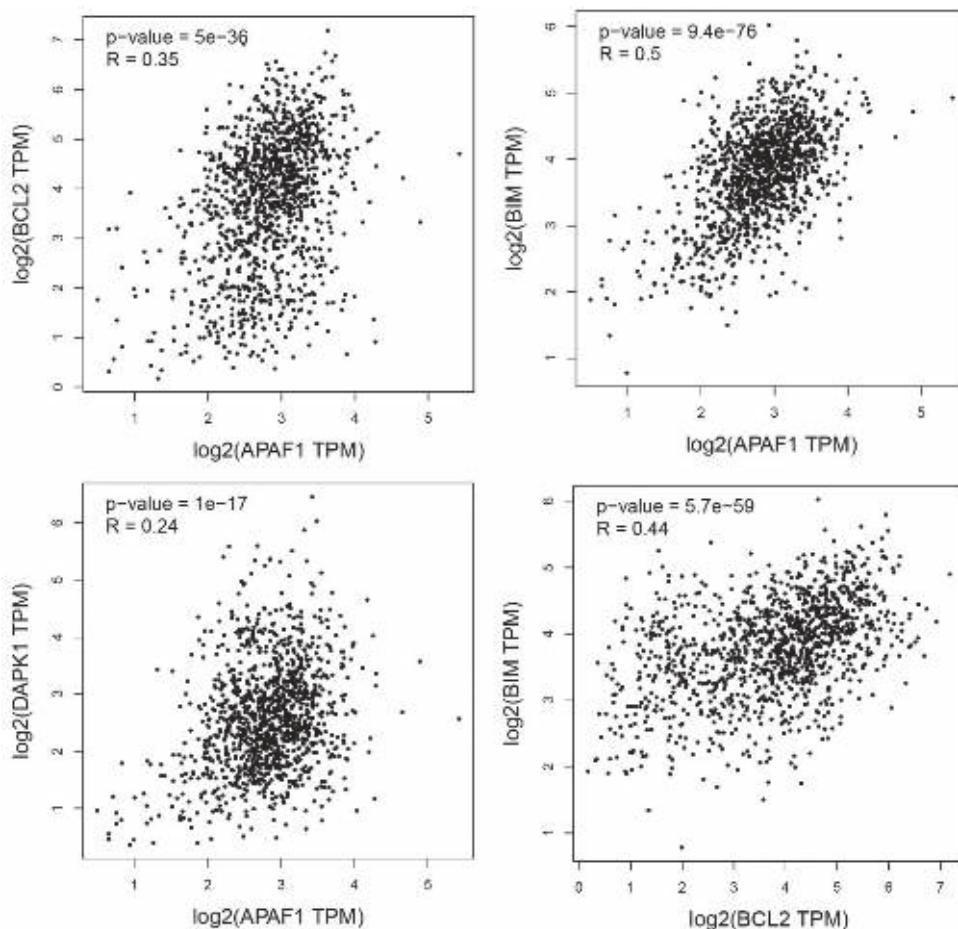


Рис. 5. Корреляция относительных уровней экспрессии генов *APAF1*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* по данным TCGA (1085 образцов РМЖ и 112 нормы) (построено в GEPIA 2.0, <http://gepia.cancer-pku.cn/>, accessed on 20 April 2024).

Fig. 5. Correlation of relative gene expression levels of *APAF1*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* according to TCGA data (1085 breast cancer samples and 112 normal samples) (built in GEPIA 2.0, <http://gepia.cancer-pku.cn/>, accessed on April 20, 2024).

в опухолях молочной железы. Сети совместной экспрессии генов широко используют для связывания генов с неизвестной функцией с их совместным участием в общих биологических процессах [17]. С привлечением базы данных ncPath (<http://ncpath.pianlab.cn/№/Home>) мы провели анализ обогащения по функциональной принадлежности и установили, что белоккодирующие гены *APAF1*, *BAK1*, *VAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* участвуют также, помимо известных процессов апоптоза (hsa04210) и p53-сигнального пути (hsa04115), в таких сигнальных путях как устойчивость к ингибиторам тирозинкиназы EGFR (hsa01521), некроптоз (hsa04217), нарушение регуляции транскрипции при раке (hsa05202), аутофагия (hsa04140), РМЖ (hsa05224) и др. Таким образом, предположение об участии исследуемых белоккодирующих генов в общих сигнальных путях и биологических процессах получило подтверждение при анализе базы данных ncPath. И нами также показано, что ко-метилирование может служить признаком совместного участия группы генов в общих биологических процессах.

Стоит указать, что данные о ко-метилировании генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *VAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* ранее не сообщались (PubMed 2023/05/06) и представленные данные имеют фундаментальное значение.

Гиперметилирование белоккодирующих генов *APAF1*, *BCL2* показано и при других видах рака, например, при раке прямой кишки и поджелудочной железы [1, 10]. В работе [19] авторами отмечается, что метилирование промотора гена *DAPK1* может приводить к инактивации гена и, как следствие, может быть связано с прогрессированием рака шейки матки.

Заключение

Таким образом, в данной работе показана ассоциация высокого уровня метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *DAPK1* с более поздними стадиями РМЖ, и размером опухоли T₃-T₄, а генов *APAF1* и *VIM* с наличием метастазов в лимфатические узлы. Впервые установлены положительные корреляции относительного уровня метилирования для генов *BCL2 – VIM*, *APAF1 – DAPK1*, *APAF1 – VIM*, *APAF1 – BCL2* ($r_s\{0,30-0,46\}$; $p<0,05$). Полученный результат согласуется с данными корреляционного анализа экспрессии базы данных GEPiA 2.0. Кроме того, анализ обогащения по функциональной принадлежности базы данных ncPath позволил установить ко-регуляцию и совместное участие в общих сигнальных путях для ряда генов системы апоптоза.

Изучение молекулярных механизмов развития и прогрессии РМЖ, а также новое представление

о паттернах метилирования генов системы апоптоза приблизит к открытию новых мишеней для таргетной терапии РМЖ. Гиперметилирование промоторных CpG-островков исследуемых генов вносит вклад в дерегуляцию их экспрессии и непосредственно влияет на функции этой группы генов, участвующих в различных каскадах сигнальных путей.

Благодарность. Авторы благодарят сотрудников ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» за сбор и клинико-гистологическую характеристику образцов РМЖ.

Литература

(п.п. 2-19 см. References)

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

References

1. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. *Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2021 godu (zabolevaemost' i smertnost')]. Moscow: MNI OI Herzen – branch of the «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of Russia; 2022. (in Russian)
2. Petri B.J., Klinge C.M. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39: 837–86. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09905-7>
3. Garcia-Martinez L., Zhang Y., Nakata Y., Chan H.L., Morey L. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nat. Commun.* 2021; 12: 1786. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22024-3>
4. Dhillon S. Decitabine/Cedazuridine: First Approval. *Drugs.* 2020; 80: 1373–8. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01389-7>
5. Pasculli B., Barbano R., Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol.* 2018; 51: 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.007>
6. Brown L.J., Achinger-Kawecka J., Portman N., Clark S., Stirzaker C., Lim E. Epigenetic therapies and biomarkers in breast cancer. *Cancers.* 2022; 14: 474. <https://doi.org/10.3390/cancers14030474>
7. Szczepanek J., Skorupa M., Jarkiewicz-Tretyn J., Cybulski C., Tretyn A. Harnessing Epigenetics for Breast Cancer Therapy: The Role of DNA Methylation, Histone Modifications, and MicroRNA. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 7235. <https://doi.org/10.3390/ijms24087235>
8. Zhang X., Zhang X., Sun B., Lu H., Wang D., Yuan X., Huang Z. Detection of aberrant promoter methylation of RNF180, DAPK1 and SFRP2 in plasma DNA of patients with gastric cancer. *Oncol Lett.* 2014; 8: 1745–50. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2410>
9. Tan Y.L., Chen H., Wu Z.K., He J., Jiang J.H. Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Absolute Methylation Quantification Revealed Hypermethylated DAPK1 in Cervical Cancer Patients. *Anal Chem.* 2021; 93: 8077–83. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01510>
10. Lukosiute-Urboniene A., Mazeika A., Kazokaite M., Silkuniene G., Silkunas M., Barauskas V., et al. Epigenetic regulation of APAF-1

- Through DNA methylation in pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2020; 40: 3765-79. doi: 10.21873/anticancerres.14366
11. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyi A.M., Pereyaslova E.A., Braga E.A., Kazubskaya T.P., et al. Role of methylation in the regulation of apoptosis genes APAF1, DAPK1, and BCL2 in breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 162: 797-800. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3716-z>
 12. Braga E.A., Burdennyi A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Fridman M.V., et al. System of markers based on the methylation of a group of proapoptotic genes in combination with MicroRNA in the diagnosis of breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2020; 168: 366-70. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04710-2>
 13. *TNM Classification of Malignant Tumours.* Eds. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Oxford, UK: John Wiley & Sons; 2017.
 14. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013; 310(20): 2191-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
 15. Hattermann K., Mehdorn H.M., Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal. Biochem.* 2008; 377(1): 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.014>
 16. Kashyap D., Garg V.K., Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021; 125: 73-120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>
 17. van Dam S., Vösa U., van der Graaf A., Franke L., de Magalhães J.P. Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions. *Brief Bioinform.* 2018; 19: 575-92. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw139>
 18. Benard A., Zeestraten E.C., Goossens-Beumer I.J., Putter H., van de Velde C.J., Hoon D.S., et al. DNA methylation of apoptosis genes in rectal cancer predicts patient survival and tumor recurrence. *Apoptosis.* 2014; 19(11): 1581-93. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1022-z>
 19. Banzai C., Nishino K., Quan J., Yoshihara K., Sekine M., Yahata T., et al. Gynecological Cancer Registry of Niigata. Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2014; 19(1): 127-32. <https://doi.org/10.1007/s10147-013-0530-0>

Сведения об авторах:

Филиппова Елена Александровна, канд. мед. наук, науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Лукина Светлана Сергеевна, науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Бурдённий Алексей Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; науч. сотр., лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБУН ИБХФ РАН;

Пронина Ирина Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; и.о. зав. каф. физиологии, экологии человека и медико-биологических знаний ФГБОУ ГУП;

Логинов Виталий Игоревич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ МГНЦ;

Аржанухина Наталья Александровна, науч. сотр., лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

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., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ МГНЦ.