

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2024

УДК 575:599.9

Селезнева Ал.Д.<sup>1</sup>, Лукина С.С.<sup>1</sup>, Селезнева Ан.Д.<sup>1</sup>, Пронина И.В.<sup>1,2</sup>, Меркулова Д.М.<sup>6</sup>,  
Казубская Т.П.<sup>3</sup>, Бурдённый А.М.<sup>1,4</sup>, Брага Э.А.<sup>1,5</sup>, Логинов В.И.<sup>1,5</sup>

### Изменение метилирования группы апоптоз-ассоциированных белок-кодирующих генов и генов длинных некодирующих РНК как фактор в нарушении их экспрессии при раке молочной железы

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Государственный университет просвещения»,  
141014, Московская область, Мытищи, Россия, ул. Веры Волошиной, д. 24;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

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

<sup>5</sup>ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова,  
115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;

<sup>6</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России  
(Сеченовский Университет),  
119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, Россия

**Предпосылки и цели.** Настоящее исследование было направлено на изучение роли изменений уровня метилирования ДНК и экспрессии мРНК белок-кодирующих генов внутренней системы апоптоза *APAF1*, *BAX* и *BIM* и генов длинных некодирующих РНК (днРНК) *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1* в возникновении и прогрессии рака молочной железы (РМЖ), а также проведение анализа кометилирования и коэкспрессии представителей этих двух групп генов.

**Методика.** Анализ уровня метилирования проводился методом количественной метил-специфичной ПЦР в реальном времени на выборке из 47 парных (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцов РМЖ. Для оценки уровня экспрессии проводили реакцию обратной транскрипции с последующей амплификацией кДНК с помощью SYBR Green ПЦР в реальном времени. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

**Результаты.** Показано статистически значимое увеличение уровня метилирования всех исследуемых генов и статистически значимое снижение уровня экспрессии генов *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* в опухолевой ткани молочной железы. Выявлены статистически значимые ассоциации уровня метилирования генов *BAX*, *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* со стадией, гена *HAND2-AS1* – с размером опухоли, гена *BIM* – с наличием метастазов в лимфатических узлах. Также продемонстрирована связь между изменением уровня экспрессии генов *BIM* и *APAF1* и показателями прогрессии РМЖ (стадией и размером опухоли). Показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением статуса метилирования промоторных CpG-островков генов *APAF1*, *BAX* и *ADAMTS9-AS2* и изменением уровня их экспрессии. Обнаружено кометилирование генов: *ADAMTS9-AS2* – *BIM/APAF1/BAX* и *HAND2-AS1* – *BAX* и ко-экспрессия генов *ADAMTS9-AS2* – *BAX*.

**Заключение.** Полученные данные могут быть использованы для обоснования применения исследуемых в работе генов в качестве маркеров для диагностики и прогноза РМЖ.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК; апоптоз-ассоциированные белок-кодирующие гены; длинные некодирующие РНК; рак молочной железы

**Для цитирования:** Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Селезнева Ан.Д., Пронина И.В., Меркулова Д.М., Казубская Т.П., Бурдённый А.М., Брага Э.А., Логинов В.И. Изменение метилирования группы апоптоз-ассоциированных белок-кодирующих генов и генов длинных некодирующих РНК как фактор в нарушении их экспрессии при раке молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(4): 4–13.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.4-13

**Участие авторов:** обработка материала, проведение исследования – Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Селезнева Ан.Д., Пронина И.В.; статистическая обработка результатов, написание текста – Селезнева Ал.Д.; сбор и описание материала – Казубская Т.П.; подготовка иллюстративного материала – Бурдённый А.М.; написание текста, редактирование статьи – Брага Э.А., Логинов В.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: **Бурдённий Алексей Михайлович**, e-mail: burdenny@gmail.com;

**Логинов Виталий Игоревич**, e-mail: loginov7w@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет средств Государственного Задания, №. FGfU-2022-0007.

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

Поступила 06.08.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

**Selezneva A.I.<sup>1</sup>, Lukina S.S.<sup>1</sup>, Selezneva An.D.<sup>1</sup>, Pronina I.V.<sup>1,2</sup>, Merkulova D.M.<sup>6</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>3</sup>,  
Burdenny A.M.<sup>1,4</sup>, Braga E.A.<sup>1,5</sup>, Loginov V.I.<sup>1,5</sup>**

## Changes in methylation of a group of apoptosis-associated protein-coding genes and long non-coding RNA genes as a factor of dysregulation of their expression in breast cancer

<sup>1</sup>Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,

8 Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation;

<sup>2</sup>State University of Education, Faculty of Natural Sciences, Department of Physiology, Human Ecology and Biomedical Knowledge,

24 Very Voloshinoy st., Moscow region, Mytishchi, 141014, Russian Federation;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, 23 Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russian Federation;

<sup>4</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,

4 Kosygina st., Moscow, 119334, Russian Federation;

<sup>5</sup>Research Centre for Medical Genetics,

1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation;

<sup>6</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Trubetskaya ul., 119991 Moscow, Russian Federation

**Background and aims.** This study focused on the role of changes in DNA methylation and mRNA expression of protein-coding genes of the intrinsic apoptosis system *APAF1*, *BAX*, and *BIM*, and long non-coding RNA (lncRNA) genes *ADAMTS9-AS2* and *HAND2-AS1* in the emergence and progression of breast cancer (BC), as well as on the analysis of co-methylation and co-expression of representatives from these two gene groups.

**Methods.** Analysis of methylation level was performed by quantitative methyl-specific real-time PCR on a sample of 47 paired (tumor/adjacent histologically normal breast tissue) BC specimens. The expression levels were evaluated by reverse transcription followed by cDNA amplification using SYBR Green real-time PCR. The significance of differences between the studied groups was assessed with the non-parametric Mann–Whitney test for independent samples. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

**Results.** The methylation level of all studied genes was significantly increased whereas the expression level of *APAF1* and *ADAMTS9-AS2* genes was significantly decreased in breast tumor tissue. Significant associations were found between the methylation level of *BAX*, *APAF1*, *HAND2-AS1*, and *ADAMTS9-AS2* genes with stage, *HAND2-AS1* gene with tumor size, and *BIM* gene with the presence of lymph node metastases. The study also demonstrated an association between changes in the expression level of *BIM* and *APAF1* genes and BC progression indicators (stage and tumor size). A significant negative correlation was shown between changes in the methylation status of promoter CpG islands of *APAF1*, *BAX*, and *ADAMTS9-AS2* genes and changes in their expression levels. Co-methylation of *ADAMTS9-AS2* – *BIM/APAF1/BAX* and *HAND2-AS1* – *BAX* genes, and co-expression of *ADAMTS9-AS2* – *BAX* genes were detected.

**Conclusion.** The obtained results can justify the use of the studied genes as markers for BC diagnosis and prognosis.

**Keywords:** DNA methylation; apoptosis-associated protein-coding genes; long non-coding RNAs; breast cancer

**For citation:** Selezneva A.I., Lukina S.S., Selezneva An.D., Pronina I.V., Merkulova D.M., Kazubskaya T.P., Burdenny A.M., Braga E.A., Loginov V.I. Changes in methylation of a group of apoptosis-associated protein-coding genes and long non-coding RNA genes as a factor of dysregulation of their expression in breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 4–13. (in Russian)  
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.4-13

**Authors' contributions:** material processing, research conduction – Selezneva A.I., Lukina S.S., Selezneva An.D., Pronina I.V.; statistical processing of results, writing the text – Selezneva A.I.; material collection and description – Kazubskaya T.P.; preparation of illustrative material – Burdenny A.M.; writing the text, editing the text – Braga E.A., 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**, e-mail: burdenny@gmail.com; **Vitaly I. Loginov**, e-mail: loginov7w@gmail.com

### Information about the authors:

Selezneva A.I., <https://orcid.org/0009-0001-5472-8879>

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

Selezneva An.D., <https://orcid.org/0009-0000-0741-3965>

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 study was carried out at the expense of the State Assignment, No. FGFU-2022-0007.

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

Received 06.08.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Результаты оценки числа новых случаев рака, а также количества смертей от различных злокачественных новообразований, предоставляемые Международным агентством по изучению рака IARC (*International Agency for Research on Cancer*), свидетельствуют о том, что онкологические заболевания по-прежнему входят в перечень основных проблем системы общественного здравоохранения. По данным на 2020 г. первую строчку в рейтинге наиболее часто диагностируемых во всем мире видов рака женской репродуктивной системы занимает рак молочной железы (РМЖ). Этот вид злокачественных новообразований был выявлен у не менее чем 2,26 млн женщин (11,7% от общего числа случаев рака) и унёс жизни более 680 000 пациенток (6,9% от общего числа смертей от рака) [1]. Приведённые выше неутешительные цифры обуславливают необходимость совершенствования существующих и создание новых систем скрининга и подходов к лечению РМЖ.

Фундаментальные исследования механизмов канцерогенеза при РМЖ и других злокачественных новообразованиях дают основания утверждать, что одним из ключевых событий в процессе опухолевой трансформации эпителиальных клеток молочной железы являются аномальные эпигенетические изменения [2]. К ним в первую очередь относится снижение или повышение уровня метилирования промоторных CpG-островков белок-кодирующих (БКГ) и регуляторных генов, следствием чего может быть их aberrантная экспрессия.

Среди множества БКГ, изменение экспрессии которых отмечено при многих злокачественных новообразованиях, нами изучены гены, участвующие в инициации и реализации внутреннего пути апоптоза (генетически детерминированного процесса клеточной гибели), в частности *BAX*, *BIM* и *APAF1*. Ген *BAX* кодирует проапоптотический белок с одноименным названием, который непосредственно участвует в образовании пор во внешней митохондриальной мембране, вследствие чего происходит увеличение её проницаемости. Ген *BIM* в свою очередь кодирует белок, регулирующий активность *BAX*, оказывая на него активирующее действие. Кроме того, он обладает способностью взаимодействовать с антиапоптотическими членами семейства *BCL2*, тем самым инактивируя их и способ-

ствуя гибели клетки [3]. Продукт гена *APAF1* участвует в образовании особого молекулярного комплекса — апоптосомы, а также активации каспазы-9 [4]. Выбор системы генов для изучения обусловлен тем, что при развитии и прогрессии злокачественных новообразований в большинстве случаев наблюдается тенденция в изменении уровня экспрессии апоптоз-ассоциированных белков. Так, количество проапоптотических белков, способствующих гибели клетки, снижается, а уровень антиапоптотических белковых молекул, ингибирующих этот процесс, наоборот возрастает.

Другой обширной группой генов, aberrантная экспрессия которых характерна для многих видов рака, являются гены некодирующих РНК, включая большую гетерогенную группу генов, кодирующих не белковый продукт, а транскрипты длиной свыше 200 нуклеотидов и называемые длинные некодирующие РНК (днРНК). Многообразие механизмов действия этих молекул определяет их способность изменять экспрессию генов, участвующих в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза, миграции, инвазии и многих других на транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях реализации генетической информации. Результаты исследований, выполненных на клеточных линиях и образцах различных видов рака, свидетельствуют о неоднозначной роли днРНК в процессе онкогенеза: одна и та же молекула днРНК может проявлять онкогенные свойства при одних условиях и онкосупрессорные — при других [5]. Исследуемые в настоящей работе гены днРНК *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1* играют роль генов-супрессоров опухолевого роста при развитии большинства злокачественных новообразований. Так, было показано, что при раке пищевода днРНК *ADAMTS9-AS2* способствует ингибированию пролиферации, инвазии и миграции клеток опухоли путём связывания и привлечения ДНК-метилтрансферазы к промотору онкогена *CDH3* [6]. Результаты другого исследования свидетельствуют о том, что подавление прогрессирования колоректального рака при участии днРНК *HAND2-AS1* обеспечивается её способностью функционировать как конкурентная эндогенная РНК (ceRNA), связывающая miR-1275, мишенью которой является мРНК гена *KLF14* [7].

На основании вышеизложенного можно заключить, что анализ метилирования белок-кодирующих и регуляторных генов, а также изучение роли этого процесса в изменении их экспрессии вероятно позволит идентифицировать новые маркеры с высоким диагностическим и прогностическим потенциалом. Кроме того, анализ кометилирования и коэкспрессии апоптоз-ассоциированных БКГ и генов днРНК может помочь в обнаружении возможных взаимодействий молекул, участвующих в реализации сигнальных каскадов, играющих ключевую роль в злокачественной трансформации клеток при РМЖ.

Целью данной работы было изучение роли изменений уровня метилирования ДНК и экспрессии мРНК группы БКГ системы апоптоза (*APAF1*, *BAX*, *BIM*) и генов днРНК (*ADAMTS9-AS2*, *HAND2-AS1*) в возникновении и прогрессии РМЖ, а также анализ кометилирования и коэкспрессии представителей этих двух групп генов.

### Методика

Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы операционного материала от 47 пациенток, клинико-морфологические характеристики которых представлены в **таблице 1** (в том числе 42 инфильтративно-протокового и 5 инфильтративно-долькового РМЖ), получали в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президен-

та РФ от 24.12.93 № 2288) и с разрешения локального этического комитета института ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» на основании соглашения от 20.01.2020 № 20/1 о взаимном сотрудничестве с ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Одним из критериев использования резекционной ткани в исследовании являлось отсутствие воздействия на больных лучевой, гормональной или химиотерапии до момента проведения операции. Клиническую классификацию всех случаев рака молочной железы проводили в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002 г.), гистологическое описание осуществляли на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в отделе патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [8]. Отобранные образцы ткани помещали в жидкий азот и далее хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в низкотемпературном холодильнике.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из опухолевой и парной гистологически нормальной ткани молочной железы по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. Для определения концентрации и оценки чистоты выделения ДНК измеряли оптическую плотность на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Далее проводили бисульфитную конверсию ДНК в растворе с последующей очисткой, после чего для оценки уровня метилирования исследуемых генов модифицированную ДНК использовали в качестве матрицы при проведении количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ). Амплификацию проводили в 96-луночных

Таблица 1/Table 1

### Клинико-морфологические параметры больных раком молочной железы

#### Clinical and morphological parameters of patients with breast cancer

Клинико-патологический параметр		N (%)
Стадия опухолевого процесса	I	11 (23.4%)
	II	25 (53.2%)
	III	11 (23.4%)
Размер первичной опухоли	T1	12 (25.5%)
	T2	28 (59.6%)
	T3	3 (6.4%)
	T4	4 (8.5%)
Лимфогенное метастазирование	N0	21 (44.7%)
	N1-3	26 (55.3%)

планшетах «Optical Reaction Plate» с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System («BioRad», США) в соответствии с протоколом производителя. Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига (Тотж) и размеры продукта МС-ПЦР-РВ для генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* взяты из [9], для генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *HAND2-AS1* – приведены в **таблице 2**, а для контрольного локуса АСТВ1 взяты из [10]. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 («Promega», США). В качестве положительного контроля 100%-ого метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 («Thermo Fisher Scientific»). Более подробно описано в [11].

Помимо геномной ДНК из 20 парных биологических образцов РМЖ методом гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции была выделена суммарная РНК [11]. Качество и концентрацию выделенной РНК определяли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов выделенную РНК использовали для

проведения реакции обратной транскрипции. Синтез первой цепи кДНК проводили в амплификаторе «T100 Thermal Cycler» («Bio-Rad», США) с использованием набора реактивов MMLV RT kit # SK021 («Евроген», Россия). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР в режиме реального времени по технологии SYBR Green. Амплификацию проводили в 96-луночных планшетах «Optical Reaction Plate» с использованием набора 5x qPCR mix-HS SYBR в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System («Bio-Rad», США). Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига (Тотж) для белок-кодирующих генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем, относительно которого и проводили нормирование продуктов амплификации исследуемых генов, взяты из работ [12, 13], а для генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *HAND2-AS1* приведены в **таблице 2**. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК.

Результаты ПЦР в реальном времени были проанализированы по методу определения величины  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [14]. Все эксперименты повторяли трижды.

Таблица 2/Table 2

**Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры ПЦР**  
**Nucleotide sequences of primers and PCR parameters**

Название гена	Последовательность олигонуклеотидов	Т <sub>отж</sub> , °С	Размер ПЦР-продукта, п.н.
<b>МС-ПЦР-РВ</b>			
<i>ADAMTS9-AS2</i>	MF: AATTTTCGATAGCGTATTTTCGGGAGTTAC	60	187
	MR: TCTTAAATTCCTCAAACACATCCTTCCT		
	UF: TTTTGATAGTGATTTTGGGAGTTATGG	60	238
	UR: AATACTCACCCCAAACACTAAACTACT		
<i>HAND2-AS1</i>	MF: CGAGGTTGGTACGCGGAG	60	121
	MR: CCGACACAACATAAACCGACTC		
	UF: TGGGGTTTTTGTGAGGTTGGTATGT	60	134
	UR: CCCC AACACAACATAAACCAACTCCTC		
<b>ПЦР-РВ</b>			
<i>ADAMTS9-AS2</i>	F: CTCCACCCGATCCTTCCATTGA R: GGGGGTCTTGCTCTTTCCTTATCC	60	199
<i>HAND2-AS1</i>	F: CCCC GAATCTGTAGTGTGGC R: CAGGCGGTGGAGAGGACT	59	113

**Примечание.** \* – все олигонуклеотиды, были подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <https://www.urogene.org/methprimer2/> с дополнительной проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR (США).

**Note.** \* – all oligonucleotides were selected using the database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> and the program <https://www.urogene.org/methprimer2/> with additional verification in the SeqBuilder Pro program, which is part of the Lasergene 17.1 software package from DNASTAR (USA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 29, включая определение медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Для оценки достоверности различий уровней метилирования и экспрессии исследуемых генов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для исследования влияния метилирования исследуемых генов на их экспрессию, а также анализа коэкспрессии и кометилирования БКГ и генов днРНК рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

### Результаты и обсуждения

Гены длинных некодирующих РНК и белок-кодирующие гены, продукты которых предположительно участвуют в развитии и прогрессии рака молочной железы, были отобраны на основании анализа интернет-источников и данных литературы в соответствии с двумя критериями: наличие CpG-островка, локализованного в пределах 2000 п.н. от 5' конца гена днРНК или БКГ, и наличие данных об изменении уровня метилирования БКГ или гена днРНК в эпителиальных опухолях каких-либо локализаций. В итоге в исследование было включено 3 БКГ: *APAF1*, *BAX* и *BIM* и 2 гена днРНК: *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1*.

Было обнаружено статистически значимое увеличение уровня метилирования всех исследуемых БКГ и генов днРНК в опухолевых образцах по сравнению с парной гистологически нормальной тканью, что может указывать на онкосупрессорную роль продуктов этих генов и их вовлеченность в патогенез РМЖ. Значения медианы (Me), а также межквартильного размаха (Q1–Q3) уровня метилирования исследуемых генов приведены в **таблице 3**.

В более ранних исследованиях было продемонстрировано гиперметилирование промоторной области генов *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* при РМЖ [15, 16]. Кроме того, данные о повышении уровня метилирования генов *BAX*, *BIM* и *HAND2-AS1* в опухолевой ткани по сравнению с гистологически нормальной прилежащей тканью согласуются с результатами исследований, выполненных в других выполненных на биологических образцах пациентов с другими онкологическими заболеваниями разных локализаций [13, 17, 18].

Данные об изменении метилирования исследуемых генов в образцах РМЖ были сопоставлены с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *BAX*, *APAF1*, *HAND2-AS1* и *ADAMTS9-AS2* на III стадии РМЖ по сравнению с более ранними стадиями (I–II) (**рис. 1, а/а**). Также продемонстрировано, что уровень метилирования гена *HAND2-AS1* статистически значимо выше в образцах с большим размером опухоли (T3/T4 против T1/T2) (**рис. 1, б/б**). Кроме того, статистически значимо высокий уровень метилирования гена *BIM* был связан с наличием метастазов в лимфатических узлах (N1-3 против N0) (**рис. 1, в/в**).

Результаты анализа профиля экспрессии исследуемых БКГ и генов днРНК в 20 парных образцах РМЖ показали снижение уровня экспрессии 2 из 5 исследуемых генов (*APAF1* и *ADAMTS9-AS2*) в опухолевой ткани молочной железы в сравнении с гистологически неизменной нормой (**рис. 2, а/а**). В более ранних зарубежных исследованиях также была отмечена aberrantная экспрессия данных генов при РМЖ [15, 16].

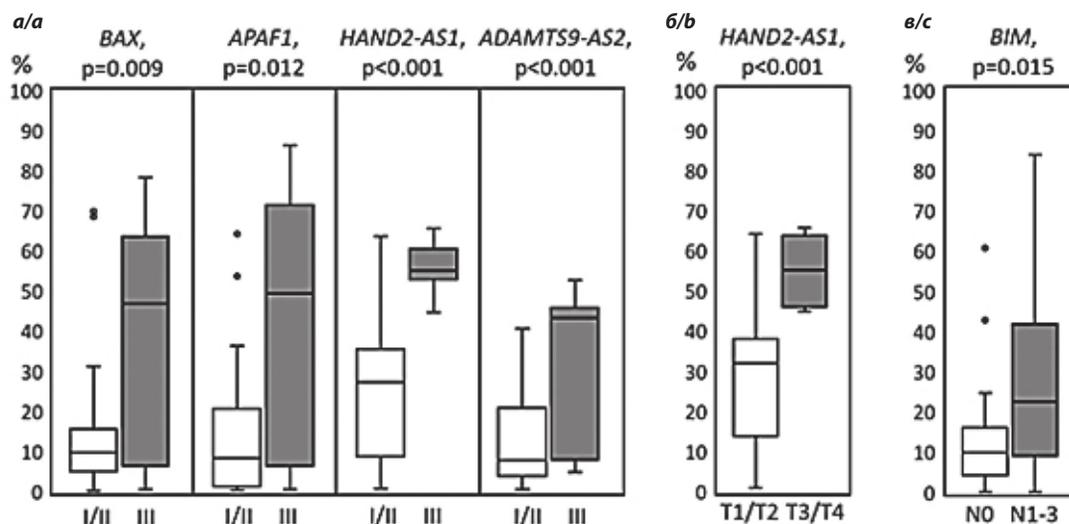
Данные об изменении экспрессии исследуемых генов в образцах РМЖ были сопоставлены с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Было выявлено статистически значимое снижение

Таблица 3/Table 3

**Значения уровня метилирования белок-кодирующих генов системы внутреннего пути апоптоза и генов днРНК в образцах РМЖ и прилежащей гистологически нормальной ткани молочной железы**

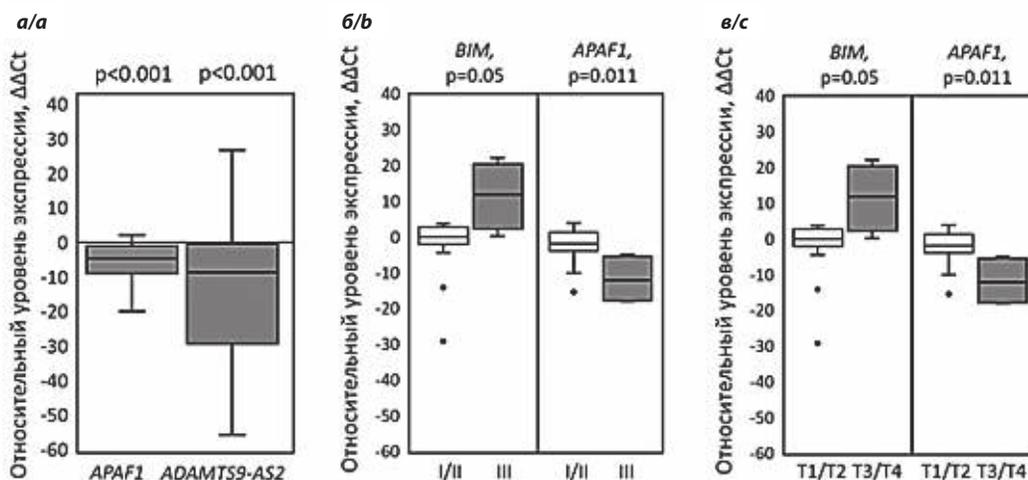
**Methylation levels of protein-coding genes of the intrinsic apoptotic pathway system and lncRNA genes in breast cancer samples and adjacent histologically normal breast tissue**

Название гена	<i>p</i>	Me (Q1–Q3)	
		Опухоль	Норма
<i>BIM</i>	<0.001	13.67 (6.22–33.74)	4.15 (0.33–13.50)
<i>BAX</i>	0.038	10.16 (5.33–27.45)	7.32 (4.27–12.42)
<i>APAF1</i>	<0.001	9.18 (1.29–32.17)	1.90 (0.75–5.16)
<i>HAND2-AS1</i>	<0.001	33.10 (18.65–45.91)	3.46 (1.76–7.70)
<i>ADAMTS9-AS2</i>	<0.001	11.34 (4.56–28.57)	4.58 (2.48–8.21)



**Рис. 1.** Связь уровня метилирования белок-кодирующих генов системы апоптоза и генов днРНК со стадией онкологического процесса – а, размером опухоли – б и лимфогенным метастазированием – в. Нижняя и верхняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют первому и третьему квартилям (внутри прямоугольника попадает 50% наблюдений). Линия внутри прямоугольника соответствует медиане (Me). Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечены максимальное и минимальное значения, которые не являются выбросами. Выбросы (значения, отличающиеся от межквартильного размаха более, чем в полтора раза) отмечены кружками. Ось Y – уровень метилирования, %; ось X – анализируемые группы.

**Fig. 1.** The relationship between the methylation level of protein-coding genes of the apoptosis system and lncRNA genes with the stage of the oncological process – a, tumor size – b and lymphogenous metastasis – c. The lower and upper boundaries of the rectangles in the diagrams correspond to the first and third quartiles (50% of observations fall inside the rectangle). The line inside the rectangle corresponds to the median (Me). The lines above and below the rectangles mark the maximum and minimum values, which are not outliers. Outliers (values differing from the interquartile range by more than one and a half times) are marked with circles. Y-axis – methylation level, %; X-axis – analyzed groups.



**Рис. 2.** Результаты анализа экспрессии белок-кодирующих генов системы апоптоза *APAF1*, *BIM* и гена днРНК *ADAMTS9-AS2*.

*a* – диаграммы размаха значений уровня экспрессии мРНК гена *APAF1* и днРНК *ADAMTS9-AS2* при РМЖ, выраженных в значениях  $\Delta\Delta Ct$ ; *b* – связь уровня экспрессии мРНК генов *APAF1*, *BIM* со стадией онкологического процесса; *c* – связь уровня экспрессии мРНК генов *APAF1*, *BIM* с размером опухоли.

**Fig. 2.** Results of the expression analysis of *APAF1*, *BIM* the apoptosis system protein-coding genes and the *ADAMTS9-AS2* lncRNA gene.

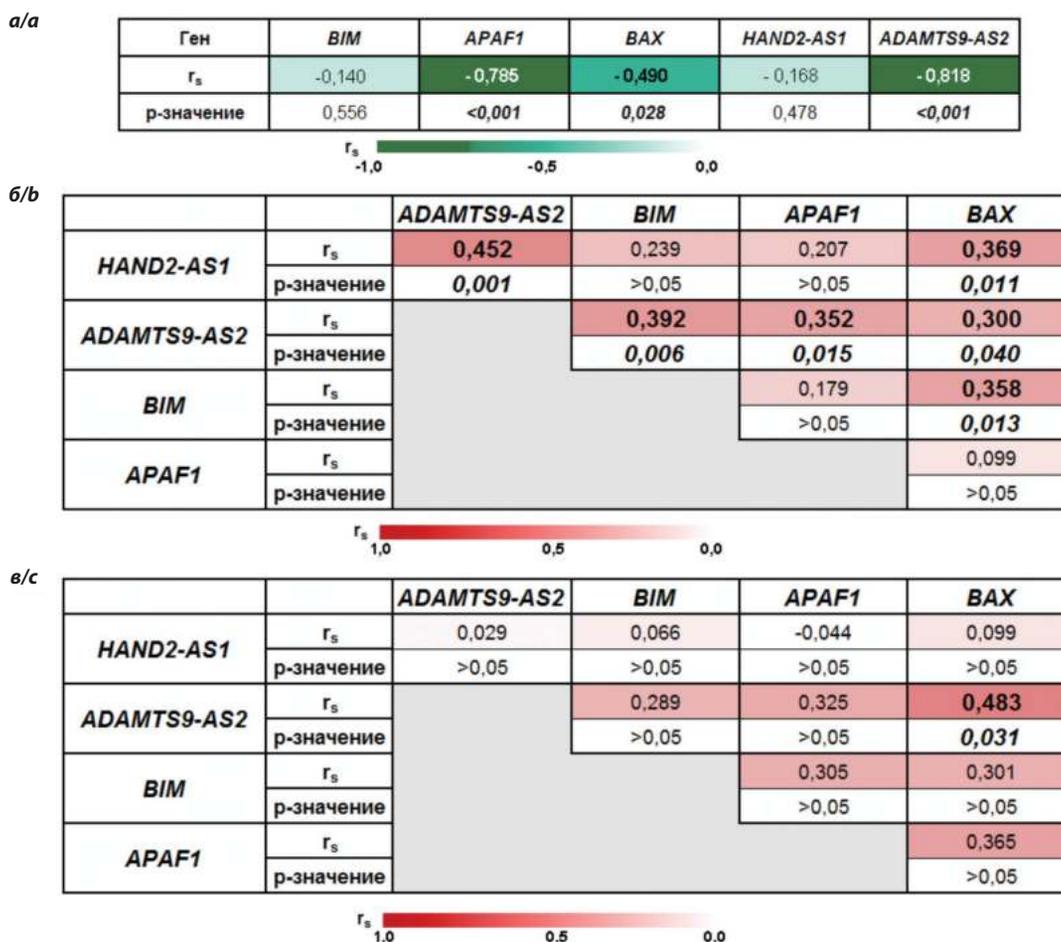
*a* – diagrams of the range of the expression levels of *APAF1* mRNA and *ADAMTS9-AS2* lncRNA in breast cancer, expressed in  $\Delta\Delta Ct$  values; *b* – the relationship between the level of mRNA expression of the genes *APAF1*, *BIM* with the stage of the oncological process; *c* – the relationship between the level of mRNA expression of the genes *APAF1*, *BIM* with the tumor size.

уровня экспрессии гена *APAF1* на III стадии РМЖ по сравнению с более ранними стадиями (I–II), а также в образцах с большим размером опухоли (T1/T2 против T3/T4) (рис. 2, б/б, в/с). При этом для гена *BIM* ситуация была ровно противоположной: на более поздних стадиях заболевания и в опухолях молочной железы большего размера наблюдалось увеличение уровня его экспрессии (рис. 2, б/б, в/с).

Ассоциации между изменением уровня экспрессии и наличием метастазов в лимфатических узлах ни для одного из исследуемых генов показано не было. В литературе встречаются единичные работы, которые косвенно подтверждают полученные нами экспериментальные данные о связи уровня экспрессии гена *APAF1* со стадией РМЖ и размером опухоли. Так, в ра-

боте В.К. Ahn и соавт. была выявлена ассоциация между снижением уровня экспрессии гена *APAF1* и клинико-патологическими характеристиками опухолей при колоректальном раке [19]. В то же время исследования, выполненные на других видах рака показывают отличную от выявленной нами связь между изменением уровня экспрессии гена *BIM* и показателями прогрессии РМЖ, что может указывать на разные механизмы действия и разную роль продукта данного гена в прогрессии различных онкологических заболеваний [13, 20].

С использованием коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ) была показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением уровня метилирования промоторных CpG-островков ге-



**Рис. 3.** Ассоциация изменения уровней экспрессии с уровнями метилирования исследуемых белок-кодирующих генов *APAF1*, *BAX* и *BIM* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1* – а; кометилирование – б; коэкспрессия – в;  $r_s$  – коэффициент корреляции Спирмена; статистически значимые корреляции выделены жирно курсивом ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 3.** Association of changes in expression levels with methylation levels of the studied protein-coding genes *APAF1*, *BAX* and *BIM* and lncRNA genes *ADAMTS9-AS2* and *HAND2-AS1* – a; comethylation – b; coexpression – c;  $r_s$  – Spearman correlation coefficient; statistically significant correlations are highlighted in bold italics ( $p \leq 0.05$ ).

нов *APAF1*, *BAX* и *ADAMTS9-AS2* и изменением уровня их экспрессии (рис. 3, а/а), что указывает на роль aberrантного метилирования данных генов в нарушении их экспрессии при РМЖ. Полученные нами результаты оценки влияния метилирования промоторных областей генов *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* на их экспрессию находят подтверждение в более ранних работах [15, 16], при этом связь между снижением уровня экспрессии гена *BAX* и гиперметилированием его промоторного CpG-островка на репрезентативной выборке образцов РМЖ показана впервые.

Данные по изменению уровня метилирования исследуемых БКГ были сопоставлены с данными по изменению уровня метилирования генов днРНК. С использованием коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ) была показана статистически значимая положительная корреляция между уровнем метилирования промоторных CpG-остроек генов *BIM* и *ADAMTS9-AS2*, *APAF1* и *ADAMTS9-AS2*, а также *BAX* и *HAND2-AS1*, *ADAMTS9-AS2* (рис. 3, б/б). Кроме того, нами был проведен анализ коэкспрессии исследуемых БКГ и генов днРНК. В результате была показана положительная корреляция между уровнем экспрессии мРНК гена *BAX* и днРНК *ADAMTS9-AS2* (рис. 3, в/в), что может указывать на возможное опосредованное взаимодействие между ними, это косвенно подтверждается рядом исследований, раскрывающих механизмы действия днРНК, в частности продемонстрировавших их способность действовать как «губка» (sponge) для молекул микроРНК [21]. Стоит отметить, что однонаправленное изменение уровня экспрессии этих генов ранее было отмечено при раке печени, при этом подобные данные на образцах РМЖ получены впервые [22].

### Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что метилирование белок-кодирующих генов *BIM*, *BAX* и *APAF1*, а также генов днРНК *HAND2-AS1* и *ADAMTS9-AS2* вовлечено в возникновение и прогрессию РМЖ, а изменение уровня метилирования в промоторных областях генов *APAF1*, *BAX* и *ADAMTS9-AS2* играет главную роль в нарушении их экспрессии. Кроме того, в нашей работе отмечено кометилирование генов *BIM – ADAMTS9-AS2*, *APAF1 – ADAMTS9-AS2*, *BAX – HAND2-AS1 / ADAMTS9-AS2* и коэкспрессия генов *BAX – ADAMTS9-AS2*, указывающая на возможное опосредованное взаимодействие продуктов этих генов. Полученные данные расширяют представления о роли изменений уровня метилирования и экспрессии исследуемых генов в процессе онкогенеза при РМЖ и указывают на возможность их ис-

пользования в качестве биомаркеров для диагностики и прогноза течения заболевания, а также в качестве мишеней для противоопухолевой терапии. Стоит отметить, что для формулировки окончательных выводов необходимо воспроизведение полученных нами результатов на выборке, включающей большее количество образцов.

### Литература

#### (п.п. 1-2; 4-8; 10; 12; 14-22 см. References)

3. Сеничкин В.В., Первущин Н.В., Зуев А.П., Животовский Б., Копейна Г.С. Таргетирование белков семейства Bcl-2: что, где, когда? *Биохимия*, 2020; 85(10): 1421–41. <https://doi.org/10.31857/S0320972520100097>
9. Брага Э.А., Бурденный А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Фридман М.В. и др. Система маркеров на основе метилирования группы проапоптотических генов в комбинации с микроРНК в диагностике рака молочной железы. *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.* 2019; 168(9): 338–42. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04710-2>
11. Филиппова Е.А. *Аномальная экспрессия и aberrантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников*: Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. М.; 2020.
13. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хохлова С.В., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов апоптоза при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(4): 5–12. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.5-12>

### References

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74(3): 229–63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>. 38572751
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022; 12(1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
3. Senichkin V.V., Pervushin N.V., Zuev A.P., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. Targeting Bcl-2 Family Proteins: What, Where, When? *Biochemistry (Mosc)*. 2020; 85(10): 1210–26. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S0320972520100097>
4. Yuan S., Akey C.W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*. 2013; 21(4): 501–15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
5. Zhang X., Wang W., Zhu W., Dong J., Cheng Y., Yin Z., et al. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(22): 5573. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>
6. Liu D., Wu K., Yang Y., Zhu D., Zhang C., Zhao S. Long noncoding RNA ADAMTS9-AS2 suppresses the progression of esophageal cancer by mediating CDH3 promoter methylation. *Mol. Carcinog.* 2020; 59(1): 32–44. <https://doi.org/10.1002/mc.23126>
7. Zhou J., Lin J., Zhang H., Zhu F., Xie R. LncRNA HAND2-AS1 sponging miR-1275 suppresses colorectal cancer progression by up-regulating KLF14. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 503(3): 1848–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.125>

8. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *Union for International Cancer Control (UICC). TNM classification of malignant tumors, 8<sup>th</sup> edn.* Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2017.
9. 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(3): 366-70. (In Russian). <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04710-2>
10. 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>
11. Filippova E.A. *Abnormal expression and aberrant methylation of genes and microRNAs associated with apoptosis in the pathogenesis of the mammary gland and ovaries:* Dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences. Moscow; 2020. (In Russian)
12. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyi 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. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>
13. Gubenko M.S., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., et al. DNA methylation in regulation of the apoptosis gene expression in non-small cell lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(4): 5-12. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.5-12> (in Russian)
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
15. Eskandari-Nasab E., Hashemi M. Promoter Methylation and mRNA Expression of APAF-1 Gene in Breast Cancer. *Gene Cell Tissue.* 2017; 4(1): e13332. <https://doi.org/10.17795/gct-43748>
16. Deva Magendhra Rao A.K., Patel K., Korivi Jyothiraj S., Meenakumari B., Sundersingh S., Sridevi V., et al. Identification of lncRNAs associated with early-stage breast cancer and their prognostic implications. *Mol Oncol.* 2019; 13(6): 1342-55. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12489>
17. Mhaidat N.M., Al Sheyab F.M., Zyoud A.M., Alzoubi K.H., Khabour O.F., AL-Quraan N.A., et al. Study the epigenetic down-regulation of Bim on colorectal cancer chemotherapy response. *Journal of King Saud University-Science.* 2019; (31): 308-13. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.09.012>
18. Samadi P., Shahnazari M., Shekari A., Maghool F., Jalali A. A pan-cancer analysis indicates long noncoding RNA HAND2-AS1 as a potential prognostic, immunomodulatory and therapeutic biomarker in various cancers including colorectal adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* 2023; 23(1): 307. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03163-7>
19. Ahn B.K., Kim S.H., Paik S.S., Lee K.H. Loss of APAF-1 expression is associated with early recurrence in stage I, II, and III colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2016; 401(8): 1203-10. <https://doi.org/10.1007/s00423-016-1483-3>
20. Yuan H., Tu S.L., He X.J. Relationship between PUMA and BIM expression in colorectal cancer and tumor invasion, metastasis and prognosis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2013; 51(6): 547-51. (in Chinese)
21. Wang A., Jin C., Li H., Qin Q., Li L. LncRNA ADAMTS9-AS2 regulates ovarian cancer progression by targeting miR-182-5p/FOXF2 signaling pathway. *Int J Biol Macromol.* 2018; 120(Pt B): 1705-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.179>
22. Li H., Huang H., Li S., Mei H., Cao T., Lu Q. Long non-coding RNA ADAMTS9-AS2 inhibits liver cancer cell proliferation, migration and invasion. *Exp Ther Med.* 2021; 21(6): 559. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9991>

**Сведения об авторах:**

**Селезнева Алена Дмитриевна**, лаборант-исследователь, лаб. патогеномики и транскриптомики

ФГБНУ НИИОПП;

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

**Селезнева Анна Дмитриевна**, лаборант-исследователь, лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Пронина Ирина Валерьевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики

ФГБНУ НИИОПП;

**Меркулова Дина Мироновна**, доктор мед. наук, проф. каф. нервных болезней, руководитель неврологического центра, e-mail: dinamerkl@mail.ru;

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

**Бурдённий Алексей Михайлович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Брага Элеонора Александровна**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Логинов Виталий Игоревич**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП.