

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2025

УДК 575:599.9

Селезнева Ан.Д.¹, Иванова Н.А.¹, Селезнева Ал.Д.¹, Лукина С.С.¹, Казубская Т.П.², Бурдённый А.М.^{1,3}, Брага Э.А.¹, Логинов В.И.¹

Аберрантное метилирование и экспрессия белок-кодирующих генов системы деметилирования и генов длинных некодирующих РНК при светлоклеточном раке почки

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115522, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

³ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, 119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4

Предпосылки. Ключевую роль в развитии и прогрессии опухолей играют эпигенетические изменения. В частности, результаты многочисленных исследований однозначно подтверждают вовлеченность в онкогенез аномального метилирования ДНК в промоторных CpG-островках ряда белок-кодирующих генов (БКГ), генов микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК). Результатом аномального метилирования ДНК может стать ингибирование транскрипции генов-супрессоров, обеспечивающих в нормальных клетках защиту от злокачественной трансформации. Одной из причин, которая приводит к аномальному метилированию ДНК, может быть нарушение в работе генов семейства диоксигеназ TET. **Целью** настоящей работы является исследование роли изменений уровня метилирования и экспрессии белок-кодирующих генов *TET1*, *TET2* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в патогенезе светлоклеточного рака почки.

Методика. В работе использовали парные образцы операционного материала (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань) от 47 пациентов с диагнозом «светлоклеточный рак почки», которые были собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Уровень метилирования анализировали с помощью количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени. 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. Для исследования влияния метилирования исследуемых генов на их экспрессию, а также анализа коэкспрессии и кометилирования БКГ и генов днРНК рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Все статистические расчеты проводили в программе IBM SPSS Statistics 29. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Впервые показано статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и *GAS5* в ткани опухоли больных скПРК по сравнению с нормальной тканью. Для генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и *GAS5* также зафиксировано статистически значимое снижение уровня их экспрессии в опухолевых образцах, тогда как для гена *TET2* отмечено увеличение уровня экспрессии в опухолевой ткани. Выявлены значимые ассоциации статуса метилирования генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* со стадией заболевания и наличием метастазов в лимфатические узлы, а *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* – с размером первичной опухоли. Кроме того, обнаружено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *ADAMTS9-AS2* на более поздних (III–IV) стадиях заболевания, а гена *SNHG6* – при увеличении размера новообразования. Показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением статуса метилирования промоторных CpG-островков генов *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* и изменением уровня их экспрессии. Выявлена достоверная корреляция между уровнями метилирования промоторных областей для трех пар генов «днРНК–БКГ» (*ADAMTS9-AS2* / *SNHG6* – *TET1*, *GAS5* – *TET2*) и между уровнями экспрессии для двух пар генов «днРНК–мРНК» (*GAS5* – *TET1*, *SNHG6* – *TET2*).

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о вовлеченности аберрантного метилирования в возникновение и прогрессию светлоклеточного рака почки, а также указывают на потенциальную применимость выявленных закономерностей в прогнозировании и диагностике данного заболевания.

Ключевые слова: метилирование; экспрессия генов; TET-белки; длинные некодирующие РНК; светлоклеточный рак почки

Для цитирования: Селезнева Ан.Д., Иванова Н.А., Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Казубская Т.П., Бурдённый А.М., Брага Э.А., Логинов В.И. Аберрантное метилирование и экспрессия белок-кодирующих генов системы деметилирования и генов длинных некодирующих РНК при светлоклеточном раке почки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 4–13.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.4-13

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

Для корреспонденции: **Бурденный Алексей Михайлович**, e-mail: burdenny@gmail.com;
Логинов Виталий Игоревич, e-mail: loginov7w@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств Государственного задания, №. FG FU-2025-0010.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.01.2025

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Selezneva An.D.¹, Ivanova N.A.¹, Selezneva Al.D.¹, Lukina S.S.¹, Kazubskaya T.P.², Burdenny A.M.^{1,3}, Braga E.A.¹, Loginov V.I.¹

Aberrant methylation and expression of protein-coding genes of the demethylation system and long non-coding RNA genes in clear cell renal cell carcinoma

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russian Federation;

²Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 23 Kashirskoe highway, Moscow, 115522, Russian Federation;

³Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina str., Moscow, 119334, Russian Federation

Background. Epigenetic changes play a key role in tumor emergence and progression. Specifically, multiple studies have unequivocally reported the involvement in oncogenesis of abnormal DNA methylation in the promoter CpG islands of a number of protein-coding genes, miRNA genes, and long non-coding RNA (lncRNA) genes. Abnormal DNA methylation can result in the inhibition of the transcription of suppressor genes that normally protect cells from malignant transformation. One cause for the abnormal DNA methylation may be disordered functioning of the TET family dioxygenase genes. **Objective.** The aim of this study was to investigate the role of changes in the levels of methylation and expression of *TET1*, *TET2* protein-coding genes and *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* lncRNA genes in the pathogenesis of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).

Methods. Paired samples of surgical material (tumor/adjacent histologically normal tissue) from 47 patients diagnosed with ccRCC were used in the study. The samples were collected and clinically characterized at the Research Institute of Clinical Oncology of the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Methylation levels were analyzed by quantitative methyl-specific real-time PCR. The expression level was assessed by reverse transcription reaction followed by cDNA amplification using SYBR Green real-time PCR. Significance of differences between the studied groups was analyzed with the non-parametric Mann-Whitney test for independent samples. The effect of gene methylation on their expression and the co-expression and co-methylation of protein-coding genes and lncRNA genes were analyzed using the Spearman's correlation coefficient. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS Statistics 29 software. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results. For the first time, this study showed a significant increase in the methylation levels of *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, and *GAS5* genes in tumor tissue from ccRCC patients compared to normal tissue. Also, the *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, and *GAS5* genes demonstrated significant decreases in their expression level in tumor samples, while the *TET2* gene expression level was increased in tumor tissue. Significant correlations of the methylation status of *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes with the disease stage and the presence of lymph node metastases were found, and *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, and *SNHG6* methylation correlated with the primary tumor size. In addition, the expression level of the *ADAMTS9-AS2* gene was significantly decreased in advanced (III-IV) stages of the disease, and the expression level of the *SNHG6* gene with an increase in tumor size. A statistically significant negative correlation was observed between changes in the methylation status of promoter CpG islands of the *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes and changes in their expression level. A significant correlation was found between the methylation levels of promoter regions in three "lncRNA–protein-coding gene" pairs (*ADAMTS9-AS2* / *SNHG6* – *TET1*, *GAS5* – *TET2*) and between expression levels in two "lncRNA–protein-coding gene" pairs (*GAS5* – *TET1*, *SNHG6* – *TET2*).

Conclusion. The study demonstrated the involvement of aberrant methylation in the emergence and progression of clear cell renal cell carcinoma, and also suggested the applicability of the identified patterns in the prognosis and diagnosis of this disease.

Keywords: methylation; gene expression; TET proteins; long non-coding RNA; clear cell renal cell carcinoma

For citation: Selezneva An.D., Ivanova N.A., Selezneva Al.D., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Burdenny A.M., Braga E.A., Loginov V.I. Aberrant methylation and expression of protein-coding genes of the demethylation system and long non-coding RNA genes in clear cell renal cell carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 4–13. (In Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.4-13

Author's contribution: material processing, conducting research – Selezneva An.D., Selezneva Al.D., Ivanova N.A.; statistical processing of results, writing the text – Selezneva An.D.; Lukina S.S.; collection and description of material – 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 – all co-authors.

For correspondence: *Alexey M. Burdenny*, PhD in Biology, leading researcher, laboratory of pathogenomics and transcriptomics, e-mail: burdenny@gmail.com; *Vitaly I. Loginov*, PhD in Biology, leading researcher, laboratory of pathogenomics and transcriptomics, e-mail: loginov7w@gmail.com

Information about the authors:

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

Selezneva Al.D., <https://orcid.org/0009-0001-5472-8879>

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

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-2025-0010.

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

Received 15.01.2025

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

На сегодняшний день онкологические заболевания остаются глобальной проблемой общественного здравоохранения. Данное утверждение справедливо и в отношении рака почки. Так, согласно наиболее свежему отчету IARC (International Agency for Research on Cancer), в 2022 г. этот диагноз был поставлен более 434 тыс. человек во всем мире (2,2% от общего числа случаев), около 156 тыс. пациентов в результате болезни скончались (1,6% от общего числа случаев) [1]. Наиболее распространенным подтипом указанной онкопатологии является светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР). Поскольку на ранних стадиях заболевание не сопровождается специфическими симптомами, около трети пациентов на момент постановки диагноза уже имеет отдаленные метастазы. Примерно такая же доля приходится на больных, столкнувшихся с рецидивом после полной резекции первичной опухоли. Стоит отметить, что проблема усугубляется значительной неэффективностью традиционных подходов к лечению — лучевой терапии и химиотерапии [2]. Вышесказанное подчеркивает необходимость идентификации новых биомаркеров, применимых для ранней диагностики, прогнозирования течения заболевания и выбора терапевтической стратегии. Особого внимания в данном контексте заслуживают гены, подверженные aberrантному метилированию при раке.

Метилирование ДНК является одним из ключевых эпигенетических механизмов, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов и обеспечение ее клеточной специфичности. Дерегуляция данного процесса является характерным признаком раковых клеток и может приводить к нарушению нормального паттер-

на метилирования промоторных областей различных групп генов, как белок-кодирующих, так и регуляторных. Следует отметить, что сегодня значительный интерес вызывает изучение эпигенетического статуса генов, продукты которых являются непосредственными регуляторами динамических изменений метилирования ДНК. В рамках настоящей работы выбор был остановлен на представителях семейства TET (ten-eleven translocation) — TET1 и TET2, играющих центральную роль в осуществлении активного деметилирования ДНК путем поэтапного окисления 5-метилцитозина. Согласно результатам ряда исследований, при различных видах рака гены этих диоксигеназ могут демонстрировать недостаточную или, напротив, избыточную экспрессию, притом нередко обусловленную эпигенетическими событиями [3].

Предметом нарастающего интереса современных исследований в области онкологии также являются длинные некодирующие РНК (днРНК), объединяющие набор транскриптов, не кодирующих белки и имеющих длину более 200 нуклеотидов. Способность представителей данного класса молекул функционировать в качестве регуляторов генной экспрессии на эпигенетическом, транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях определяет их вовлеченность в разнообразные клеточные процессы, включая апоптоз, дифференцировку и пролиферацию клеток [4, 5]. В свою очередь нарушение их экспрессии ведет к широкомасштабным изменениям в клеточной регуляции и может способствовать онкогенезу. Стоит отметить, что к настоящему времени обнаружено немало генов днРНК, aberrантное метилирование которых ассоциировано с развитием и прогрессией злокачественных новообразований.

Наряду с БКГ они обладают потенциалом для использования в качестве диагностических и прогностических биомаркеров при различных типах рака.

Целью работы является исследование роли изменений уровня метилирования и экспрессии белок-кодирующих генов *TET1*, *TET2* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в патогенезе светлоклеточного рака почки.

Методика

Материалом для исследования послужили парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань почки) образцы операционного материала от 47 пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В отделе патоморфологии опухолей данного исследовательского центра все опухоли были морфологически охарактеризованы на основании критериев классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [6]. Клинико-морфологические характеристики образцов скПКР представлены в **таблице 1**.

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288) и с разрешения локального этического комитета института ФГБНУ «Научно-исследовательский институт 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. Забор ткани производили только у больных, не получавших до операции лучевую, гормональную или химиотерапию. Полученный биологический материал помещали в жидкий азот и хранили при -70°C. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике фенол-хлороформной очистки, суммарную РНК – с помощью метода гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия). Оценку качества и концентрации нуклеиновых кислот осуществляли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США).

С целью анализа уровня метилирования генов проводили бисульфитную конверсию ДНК, с последующей количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ), как сообщалось ранее [7]. Амплификацию осуществляли в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с протоколом, прилагаемым к прибору, с использованием набора qPCRMix-HS

SYBR согласно протоколу производителя («Евроген», Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров и условия проведения ПЦР для контрольного гена *ACTB* и генов *SNHG6*, *GAS5* были заимствованы из работ [8-10], а для генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, представлены в **таблице 2**.

В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 («Promega», США). В качестве положительного контроля 100%-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 («Thermo Fisher Scientific»).

Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов выделенная из 20 парных биологических образцов РНК была использована для проведения реакции обратной транскрипции с помощью набора реактивов MMLV RT kit # SK021 (Евроген, Россия). Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы при проведении SYBR Green ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при помощи набора qPCRMix-HS SYBR в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System («Bio-Rad», США). Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР для контрольного гена *B2M*, а также генов *TET1*, *TET2*, *SNHG6*, *GAS5* были заимствованы из работ [9-12], а для гена *ADAMTS9-AS2* представлены в **таблице 2**. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК.

Результаты ПЦР в реальном времени были проанализированы по методу определения величины C_T [13]. Все реакции ПЦР повторяли трижды.

Таблица 1/Table 1

Клинико-морфологические параметры образцов скПКР
Clinical and morphological characteristics of patients samples with ccRCC

Клинико-морфологический параметр		n=47 (%)
Стадия опухолевого процесса	I	21 (44,68 %)
	II	9 (19,15%)
	III	12 (25,53%)
	IV	5 (10,64%)
Размер первичной опухоли	T1	21 (44,68)
	T2	9 (19,15%)
	T3	15 (31,91)
	T4	2 (4,26)
Лимфогенное метастазирование	N0	39 (82,98)
	N1-3	8 (17,02)

Таблица 2/ Table 2

Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры количественной ПЦР в реальном времени

Sequences of oligonucleotides and qPCR-RT characteristics

Название гена	Последовательность праймера	$T_{отж}, ^\circ\text{C}$	Размер ПЦР-продукта, п.н.
Анализ уровня метилирования (МС-ПЦР-РВ)			
<i>TET1</i>	MF: TTGTTTCGGCGTCGTTTGTGC MR: AACGCCTACCGACTCCCAACACA	61	184
	UF: TTTTGAGGTTTGTTTTGGGGAGATAT UR: AAAATCAATCCCAAAAATCCACAAT	57	205
<i>TET2</i>	MF: GGTTTTTATTGCGCGTTTCGTTGTAC MR: CAAACTCTCGCCGCTACACTACC	60	217
	UF: GGTGTGAGGGTAGTTTAGGTTTATTG UR: CACTACCACTACCACTACCACTCT	57	223
<i>ADAMTS9-AS2</i>	MF: AATTTTCGATAGCGTATTTCTGGGAGTTAC MR: TCTTAAATTCCTCAACACATCCTTCCT	59	187
	UF: TTTTGATAGTGATTTTGGGAGTTATGG UR: AATACTCACCCCAACACTAACTACT	56	238
Анализ уровня экспрессии			
<i>ADAMTS9-AS2</i>	F: CTCACCCGATCCTTCCATTGA R: GGGGGTCTTGCTCTTTCCTTATCC	57.9	199

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 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> database and the <https://www.urogene.org/methprimer2/> program 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, включая определение медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей, а также построение диаграмм размаха проводили при помощи программы Microsoft Excel 365 и с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 29.0.2.0. Для оценки достоверности различий уровней метилирования и экспрессии исследуемых генов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для исследования влияния метилирования анализируемых 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

Отбор генов днРНК и белок-кодирующих генов системы деметилирования, потенциально ассоциированных с возникновением и прогрессией скПКР, был выполнен на основании анализа данных литературы и интернет-источников с учетом следующих критериев: (1) наличие CpG-островка в области не далее 2000 п.н. от 5'-конца гена днРНК или 5'-конца БКГ; (2) наличие данных об изменении уровня мети-

лирования гена в эпителиальных опухолях каких-либо локализаций. В итоге были выбраны 2 белок-кодирующих гена (*TET1* и *TET2*) и 3 гена днРНК (*ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5*).

В результате анализа данных с применением критерия Манна–Уитни нами было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и *GAS5* в ткани опухоли больных скПКР по сравнению с нормальной тканью (табл. 3). Стоит отметить, что гиперметилирование вышеупомянутых генов при данном типе рака отмечено впервые.

Для перечисленных генов также было зафиксировано значимое снижение уровня их экспрессии в опухолевых образцах по отношению к нормальной ткани, тогда как для белок-кодирующего гена *TET2* наблюдали увеличение уровня экспрессии в опухолевой ткани (рис. 1). Эти данные позволяют предположить опухоль-супрессорную функцию продуктов генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* и онкогенную роль продукта гена *TET2* при светлоклеточном раке почки.

При оценке вовлеченности метилирования промоторных CpG-островков исследованных генов в изменение их уровня экспрессии были обнаружены стати-

Таблица 3/Table 3

Уровень метилирования генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в образцах скПКР и прилежащей гистологически нормальной ткани почки

TET1, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes methylation level in ccRCC samples and adjacent histologically normal kidney tissue

Название гена	$p=$	Me (Q1-Q3)	
		Опухоль	Норма
<i>TET1</i>	<0.001	22.57 (11.69–40.84)	7.53 (3.71–11.33)
<i>TET2</i>	0.841	3.71 (3.22–4.24)	3.73 (3.24–4.30)
<i>ADAMTS9-AS2</i>	0.019	10.84 (3.94–35.73)	7.78 (3.26–14.19)
<i>SNHG6</i>	<0.001	19.59 (12.08–35.81)	6.88 (3.46–13.13)
<i>GAS5</i>	<0.001	16.71 (9.24–21.51)	6.60 (3.92–13.37)

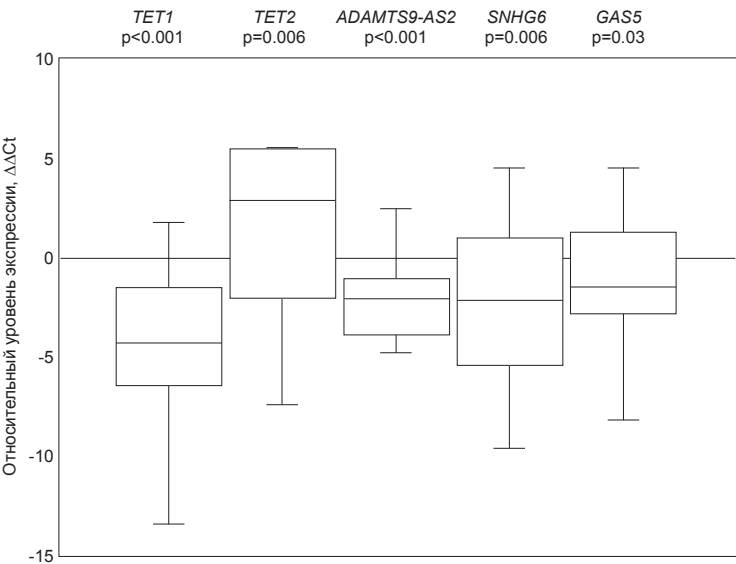


Рис. 1. Уровни экспрессии генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* (20 парных образцов скПКР) измеренные с помощью количественной SYBR Green ПЦР в режиме реального времени.

Fig. 1. Expression levels of *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes (20 paired ccRCC samples) measured by SYBR Green qPCR-RT.

Ген	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>ADAMTS9-AS2</i>	<i>SNHG6</i>	<i>GAS5</i>
r_s	-0,248	0,235	-0,686	-0,570	-0,608
р-значение	0,291	0,319	<0,001	0,009	0,004

r_s -1,0 -0,5 0,0

Рис. 2. Вовлеченность aberrантного метилирования в дерегуляцию экспрессии генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* при скПКР; r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Fig. 2. Involvement of aberrant methylation in deregulation of *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* gene expression in ccRCC; r_s – Spearman correlation coefficient.

стически значимые отрицательные корреляции между изменением уровня метилирования и уровнем экспрессии для трех генов днРНК – *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* (рис. 2). Для БКГ *TET1*, *TET2* достоверных ассоциаций показано не было.

Выявленные в ходе настоящей работы закономерности изменения уровней метилирования и экспрес-

сии гена *TET1* подтверждаются данными зарубежных исследований, выполненных на образцах больных с другими видами рака. В частности, ранее сообщалось о сниженной в результате гиперметилирования экспрессии этого гена при карциноме носоглотки [14]. Гиперэкспрессия гена *TET2* ранее была отмечена при внутрипеченочной холангиокарциноме и определена

как независимый фактор неблагоприятного прогноза у пациентов с этим видом опухоли [15]. Необходимо подчеркнуть, что наличие исследований, демонстрирующих антагонистические паттерны экспрессии обеих представителей семейства TET, говорит о тканеспецифичной роли деметилирующих ферментов в патогенезе рака [3].

В большинстве онкопатологий днРНК ADAMTS9-AS2 функционирует в качестве онкосупрессора. Так, в работе [16] показано, что она выступает в роли регулятора в сети передачи сигналов по сигнальному пути PI3K/AKT/mTOR, тем самым способствуя выживанию и росту клеток в опухоли, а также эпигенетического регулятора путем связывания «sponge» микроРНК. В то-

же время, наши данные о гиперметилировании и сниженной экспрессии гена *ADAMTS9-AS2* при скПКР указывают на опухоль-супрессорную функцию продукта гена и подтверждаются рядом публикаций зарубежных авторов [17, 18].

днРНК SNHG6, напротив, гиперэкспрессируется и демонстрирует различные онкогенные эффекты в большинстве солидных опухолей. В основе ее онкогенных свойств лежит регуляция ряда сигнальных путей опухолевых клеток, включая TGFβ/SMAD, Wnt/β-катенин, PI3K/AKT/mTOR, JNK, а также конкурентное связывание онкосупрессорных микроРНК [19]. Тем не менее, имеются единичные публикации, отмечающие снижение уровня экспрессии SNHG6,

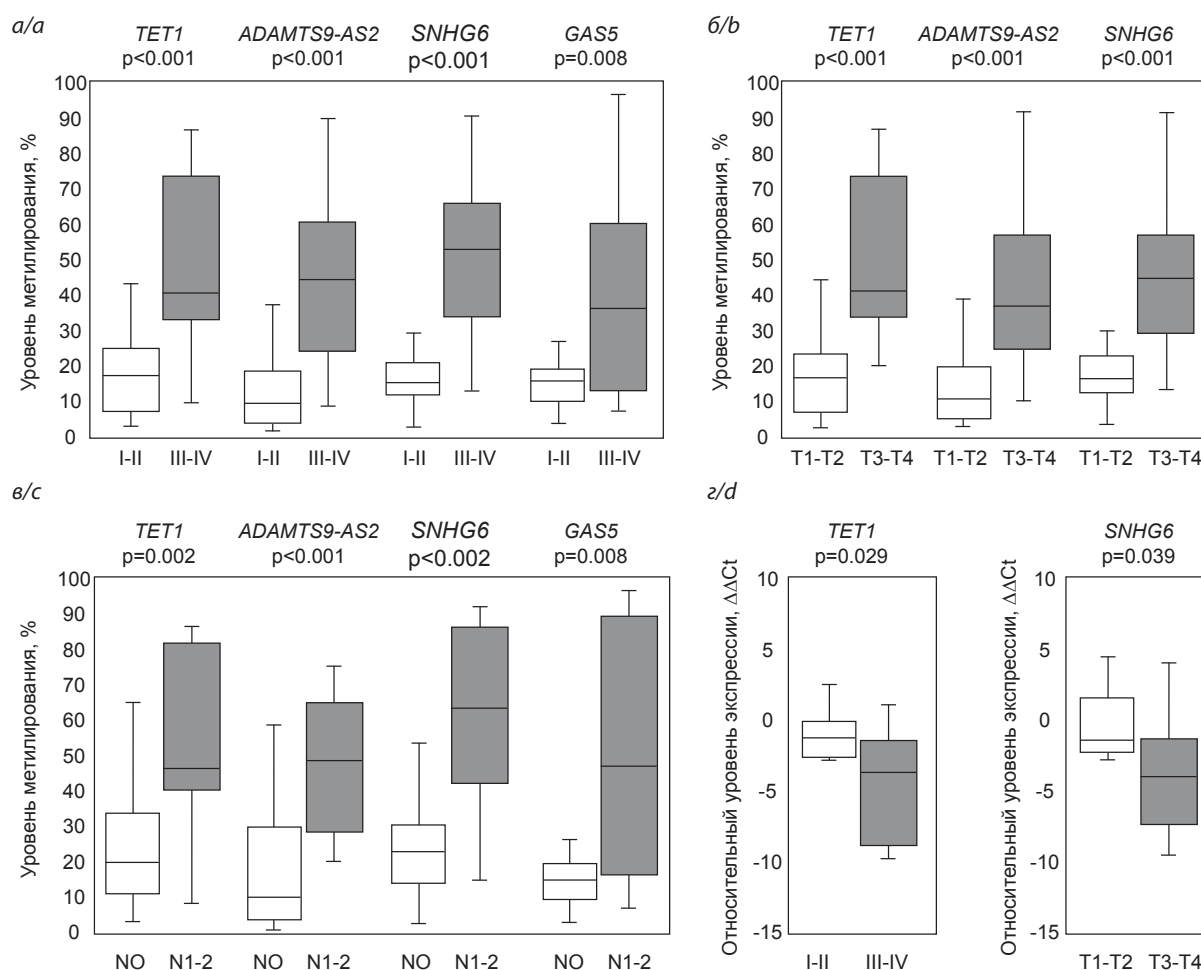


Рис. 3. Связь уровня метилирования исследованных генов со стадией онкологического процесса (а), размером опухоли (б) и наличием лимфогенного метастазирования (в). Связь уровня экспрессии исследованных генов со стадией онкологического процесса (г) и размером опухоли (д).

Fig. 3. The relationship between the methylation level of the studied genes and the stage of the oncological process (a), tumor size (b) and the presence of lymphogenous metastasis (c). The relationship between the expression level of the studied genes and the stage of the oncological process (d) and tumor size (e).

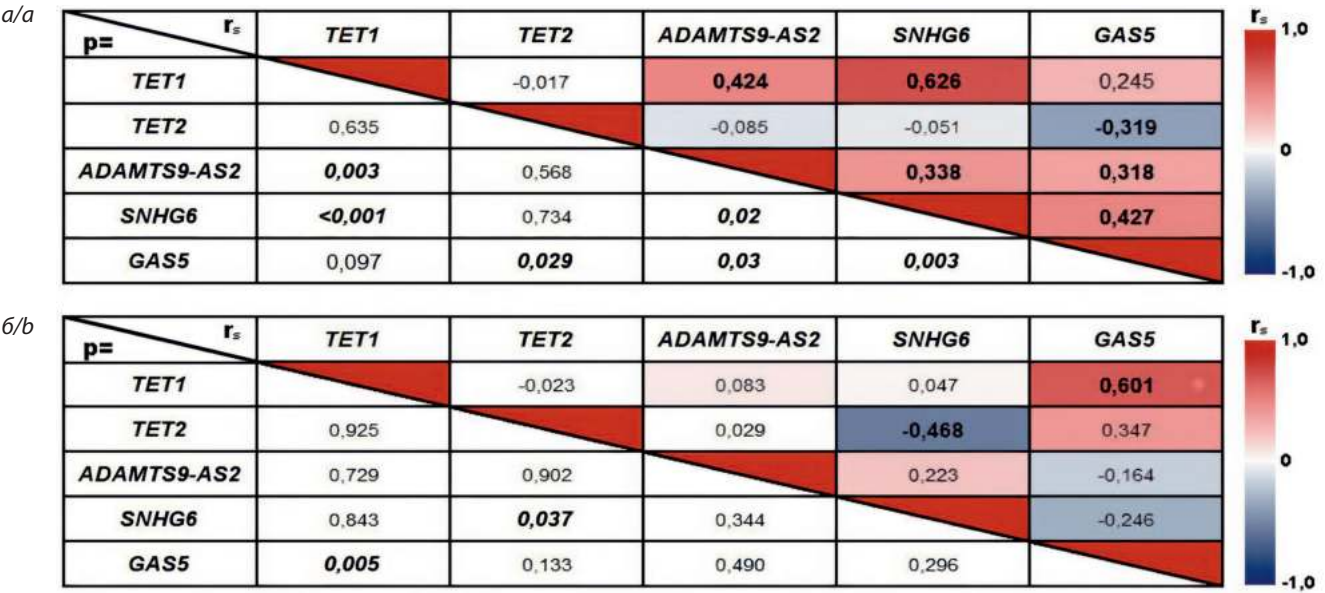


Рис. 4. Комети́рование (а) и коэкспрессия (б) генов днРНК и БКГ; r_s – коэффициент корреляции Спирмена; статистически значимые корреляции выделены жирно курсивом ($p \leq 0.05$).

Fig. 4. Comethylation (a) and coexpression (b) of lncRNA and PCG genes; r_s – Spearman correlation coefficient; statistically significant correlations are highlighted in bold italics ($p \leq 0.05$).

что согласуется с нашими результатами и может говорить о тканеспецифичности этого гена при раке [20].

Подобно двум другим анализируемым днРНК, GAS5 вовлечена в регуляцию широкого спектра сигнальных путей, ответственных за контроль пролиферации и выживаемости раковых клеток. Как и в нашем исследовании, в подавляющем большинстве научных публикаций сообщается о снижении уровня этого транскрипта при различных типах рака, в некоторых также отмечается вовлеченность гипермети́рования промоторной области в подавление экспрессии GAS5, что опять же согласуется с результатами настоящей работы [21, 22].

Во второй части исследования анализировали изменение уровня метилирования и экспрессии генов TET1, TET2, ADAMTS9-AS2, SNHG6, GAS5 в образцах первичных опухолей скПКР с учетом их патоморфологических особенностей (стадии опухолевого процесса, размера опухоли, наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования).

Проведенный анализ позволил выявить статистически значимую связь между повышением уровня метилирования всех генов днРНК (ADAMTS9-AS2, SNHG6, GAS), а также белок-кодирующего гена TET1 и увеличением тяжести течения скПКР (стадии I-II против III-IV) (рис. 3, а/а). Для генов ADAMTS9-AS2, SNHG6, GAS и TET1 также были обнаружены значимые различия уровня метилирования у пациентов с наличием и отсутствием метастазов в лимфатические узлы (N0 против N1-2) (рис. 3, в/с). Стоит отметить, что увеличение уровня метилирования генов TET1, ADAMTS9-AS2, SNHG6 было достоверно связано с увеличением размера новообразования (T1-T2 против T3-T4) (рис. 3, б/б).

При анализе уровня экспрессии исследуемых генов с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок, была выявлена статистически значимая ассоциация низкого уровня экспрессии гена ADAMTS9-AS2 с более тяжелыми (III-IV) стадиями онкологического процесса (рис. 3, з/д), а гена SNHG6 – с увеличением размера первичной опухоли (T1-T2 против T3-T4) (рис. 3, д/е).

Приведенные результаты косвенно подтверждаются данными, представленными в единичных зарубежных публикациях. Так, связь гипермети́рования промоторной области гена GAS5 со стадией заболевания и наличием лимфогенного метастазирования ранее была продемонстрирована при раке шейки матки [22]. А для гена ADAMTS9-AS2 ассоциации между снижением уровня экспрессии гена и увеличением стадии опухолевого процесса показана в работах, выполненных на образцах рака желудка, молочной железы и ряде других типов опухолей [23, 24].

С использованием коэффициента корреляции Спирмена (r_s) в ходе настоящего исследования нами также был выполнен поиск генов днРНК и БКГ, комети́рованных и коэкспрессируемых при светлоклеточном раке почки

(рис. 4). В результате была выявлена статистически значимая положительная корреляция между уровнями метилирования промоторных областей генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и белоккодирующего гена *TET1*, что может свидетельствовать о вовлеченности продуктов кометилированных пар генов в общие биологические процессы и сигнальные пути при развитии скПКР. Вместе с тем, однонаправленное изменение уровня экспрессии было показано для генов *GAS5* и *TET1*. В этом случае уместно предположить наличие опосредованного взаимодействия между указанной днРНК и мРНК гена *TET1* при посредничестве микроРНК. Проведенный анализ также позволил выявить обратную корреляцию уровней метилирования генов *GAS5* и *TET2* и уровней экспрессии генов *SNHG6* и *TET2*, что может говорить о прямом воздействии перечисленных днРНК на уровень мРНК БКГ и/или кодируемого им белка.

Заключение

Результаты настоящей работы позволяют предположить участие aberrантного метилирования белок-кодирующего гена *TET1* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в возникновении и прогрессии светлоклеточного рака почки. Стоит отметить, что наши выводы относительно природы выявленных корреляционных зависимостей уровней метилирования или экспрессии для пяти пар генов являются предварительными и требуют проверки в ходе дальнейших исследований. Полученные данные могут способствовать разработке новых диагностических и прогностических биомаркеров скПКР, а также терапевтических стратегий, направленных на коррекцию эпигенетических изменений при данном заболевании.

Литература

(п.п. 1–4; 6–24 см. References)

5. Буре И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Длинные некодирующие РНК и их роль в онкогенезе. *Молекулярная биология*. 2018; 52(6): 907–20. <https://doi.org/10.1134/S0026898418060034>

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>
2. Makhov P., Joshi S., Ghatalia P., Kutikov A., Uzzo R.G., Kolenko V.M. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and management strategies. *Mol Cancer Ther*. 2018; 17(7): 1355–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1299>
3. Joshi K., Liu S., Breslin S.J.P., Zhang J. Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2022; 79(7): 363. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04396-x>
4. 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>
5. Bure I.V., Kuznetsova E.B., Zaletaev D.V. Long noncoding RNAs and their role in oncogenesis. *Молекулярная Биология*. 2018; 52(6): 787–98. <https://doi.org/10.1134/S0026893318060031> (in Russian)
6. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Union for International Cancer Control (UICC). TNM classification of malignant tumours, 8th edn. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2017.
7. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdennyy 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. <https://doi.org/10.3390/ijms23031300>
8. 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>
9. Lukina S.S., Burdennyy A.M., Filippova E.A., Uroshlev L.A., Pronina I.V., Ivanova N.A., et al. Methylation of long noncoding RNA Genes SNHG6, SNHG12, and TINCR in ovarian cancer. *Molecular Biology*, 2024; 58(3): 429–38. <https://doi.org/10.1134/S0026893324700067>
10. Burdennyy A.M., Lukina S.S., Uroshlev L.A., Filippova E.A., Pronina I.V., Fridman M.V., et al. Hypermethylation in ovarian cancer of long noncoding RNA Genes: HOTAIR, GAS5, LINC00472, LINC00886, TUG1. *Russ J Genet*. 2024; 60(5): 665–75. <https://doi.org/10.1134/S1022795424700029>
11. Guo H., Zhu H., Zhang J., Wan B., Shen Z. TET1 suppresses colon cancer proliferation by impairing β -catenin signal pathway. *J Cell Biochem*. 2019; 120(8): 12559–65. <https://doi.org/10.1002/jcb.28522>
12. Ichimura N., Shinjo K., An B., Shimizu Y., Yamao K., Ohka F., et al. Aberrant TET1 methylation closely associated with CpG Island methylator phenotype in colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015; 8(8): 702–11. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0306>
13. 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>
14. Fan J., Zhang Y., Mu J., He X., Shao B., Zhou D., et al. TET1 exerts its anti-tumor functions via demethylating DACT2 and SFRP2 to antagonize Wnt/ β -catenin signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *Clin Epigenetics*. 2018; 10(1): 103. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0535-7>
15. Yamashita H., Tournara A., Akita M., Itoh T., Chokshi S., Ajiki T., et al. Epigenetic upregulation of TET2 is an independent poor prognostic factor for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Virchows Arch*. 2022; 480(5): 1077–85. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03251-x>
16. Xu W., Wang B., Cai Y., Chen J., Lv X., Guo C., et al. ADAMTS9-AS2: A functional long non-coding RNA in tumorigenesis. *Curr Pharm Des*. 2021; 27(23): 2722–7. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210325105106>
17. Deva Magendhra Rao A.K., Patel K., Korivi Jyothiraj S., Meenakumari B., Sundersingh S., Sridevi V., et al. Identification of In-

- cRNAs 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>
18. Song E.L., Xing L., Wang L., Song W.T., Li D.B., Wang Y., et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits cell proliferation and decreases chemoresistance in clear cell renal cell carcinoma via the miR-27a-3p/FOXO1 axis. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(15): 5705-25. <https://doi.org/10.18632/aging.102154>
 19. Wang H.S., Zhang W., Zhu H.L., Li Q.P., Miao L. Long noncoding RNA SNHG6 mainly functions as a competing endogenous RNA in human tumors. *Cancer Cell Int*. 2020; 20: 219. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01303-x>
 20. Meng S., Jian Z., Yan X., Li J., Zhang R. LncRNA SNHG6 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via the PI3K/AKT/mTOR pathway in colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2019; 20(3): 2541-48. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10510>
 21. Zhang N., Wang A.Y., Wang X.K., Sun X.M., Xue H.Z. GAS5 is downregulated in gastric cancer cells by promoter hypermethylation and regulates adriamycin sensitivity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(15): 3199-205.
 22. Yang W., Xu X., Hong L., Wang Q., Huang J., Jiang L. Upregulation of lncRNA GAS5 inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cells. *J Cell Physiol*. 2019; 234(12): 23571-80. <https://doi.org/10.1002/jcp.28926>
 23. Ren N., Jiang T., Wang C., Xie S., Xing Y., Piao D., et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits gastric cancer (GC) development and sensitizes chemoresistant GC cells to cisplatin by regulating miR-223-3p/NLRP3 axis. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(11): 11025-41. <https://doi.org/10.18632/aging.103314>
 24. Ni K., Huang Z., Zhu Y., Xue D., Jin Q., Zhang C., et al. The lncRNA ADAMTS9-AS2 regulates RPL22 to modulate TNBC progression via controlling the TGF- β signaling pathway. *Front Oncol*. 2021; 11: 654472. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.654472>

Сведения об авторах:

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

Иванова Наталья Анатольевна, мл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «НИИОПП»;

Селезнева Алена Дмитриевна, лаборант-исследователь, лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «НИИОПП»;

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

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»; мл. науч. сотр. лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

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».