

УДК 575:599.9

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК: *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *TUG1*

© А. М. Бурдённый^{1,*}, С. С. Лукина¹, Л. А. Урошлев², Е. А. Филиппова¹, И. В. Пронина¹,
М. В. Фридман², К. И. Жордания³, Т. П. Казубская³, Н. Е. Кушлинский³, В. И. Логинов^{1,4},
Э. А. Брага^{1,4,**}

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

²Институт общей генетики им. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии

им. Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения России, Москва, 115478 Россия

⁴Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

*e-mail: burdennyu@gmail.com

**e-mail: eleonora10_45@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

В последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о роли длинных некодирующих РНК (днРНК) в регуляции биологических процессов в клетке, а также в механизмах развития и прогрессии рака. Аберрантное метилирование промоторных участков, как белковых генов, так и генов днРНК, может нарушать их экспрессию и функциональную активность. С применением биоинформатических баз данных отобрано шесть генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*), имеющих CpG-островки, дифференциально экспрессируемых и предположительно гиперметилируемых в опухолях больных раком яичников (РЯ). На выборке из 93 образцов больных РЯ методом метил-специфичной ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ($p < 0.05$) повышение уровня метилирования в опухолях; причем, для генов *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1* гиперметиличивание при РЯ выявлено впервые. Для пяти генов (кроме *SNHG17*) показано дальнейшее повышение уровня метилирования на более тяжелой стадии, и для четырех генов (кроме *SNHG17* и *LINC00886*) показана значимая связь с метастазированием. С применением ОТ-ПЦР в реальном времени показано дифференциальное изменение уровня экспрессии генов *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* и значимая корреляция метилирования с экспрессией для гена *GAS5*. Таким образом, для шести генов днРНК обнаружено гиперметиличивание, ассоциированное с прогрессией и/или развитием РЯ, что важно для выяснения эпигенетических процессов, вовлеченных в патогенез РЯ, и может быть использовано в качестве новых биомаркеров РЯ.

Ключевые слова: гены длинных некодирующих РНК, *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*, аберрантное метилирование, рак яичников.

DOI: 10.31857/S0016675824050063 EDN: CJJFFC

Рак яичников (РЯ) относится к наиболее поздно выявляемым видам рака, поскольку он развивается бессимптомно вплоть до тяжелых стадий с обширным метастазированием и устойчивостью к химиотерапии, что приводит к неблагоприятному исходу [1,2]. Изучение факторов, участвующих в развитии и прогрессии РЯ, необходимо для разработки и налаживания своевременной диагностики этого вида рака.

В последние два десятилетия установлена важная роль некодирующих РНК в регуляции

экспрессии генов и сигнальных путей в онкогенезе [3]. Некодирующие РНК (нкРНК) можно условно классифицировать по длине: короткие (20–200 нуклеотидов) и длинные (примерно от 200 до десятков тысяч нуклеотидов) [4]. Среди коротких РНК наиболее изучены микроРНК, для которых установлена ключевая роль в регуляции экспрессии генов [5]. В последние годы выяснилось, что длинные нкРНК (днРНК) также играют важную роль в регуляции генов, в том числе в опухолях [6, 7]. С применением технологий секвенирования нового

поколения было доказано, что большинство геномных последовательностей транскрибируются в виде днРНК, число которых больше 100 тысяч (см. <http://www.noncode.org> и <http://www.lncrnadb.org/>), что превышает количество известных кодирующих белок генов и идентифицированных микроРНК человека [8]. Хотя исследованных и аннотированных днРНК пока значительно меньше, чем микроРНК и мРНК.

Аберрантное метилирование промоторных CpG-островков рассматривается как одна из первичных и глубинных эпигенетических модификаций генов и геномов в развитии и прогрессии рака. Показано, что гены днРНК могут регулироваться посредством метилирования, как и гены, кодирующие белки и микроРНК, в частности в опухолях [9, 10]. На данный момент имеются только единичные работы, выявляющие гиперметилирование генов днРНК в опухолях больных РЯ, однако, из этих работ следует, что гиперметилирование играет критическую роль в дерегуляции супрессорных и других функций ряда днРНК: MEG3, HAND2-AS1, ZNF667-AS1 и др. [11–14].

Цель данной работы — определить изменение уровня метилирования группы генов днРНК в опухолях больных РЯ и оценить возможную связь этих изменений с развитием и прогрессией РЯ. Для этого нами был проведен отбор группы генов днРНК, имеющих CpG-островки, согласно базам данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, <http://www.urogene.org/methprimer2/>). В исследование были включены шесть генов днРНК: *GAS5* (Growth Arrest Specific 5), *HOTAIR* (HOX Antisense Intergenic RNA), *LINC00472* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 472), *LINC00886* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 886), *SNHG17* (Small Nucleolar RNA Host Gene 17), *TUG1* (Taurine-Upregulated Gene 1). Отбор этих генов днРНК был основан на биоинформатическом анализе данных бисульфитного секвенирования ДНК из базы NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO), а также базы данных GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) об изменении уровней экспрессии этих генов при эпителиальном раке яичников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С использованием сервера NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO, a public archive and resource for gene expression data) отобраны наборы данных полногеномного бисульфитного секвенирования для генома рака яичников. Использовали две библиотеки данных с порядковыми номерами GEO Number: GSE146556 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE146555>), GSE81228 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE81228>), включавшие суммарно данные

для 33 (6 и 27) пациенток [15, 16]. Далее, с использованием языка программирования R, отбирали гиперметилированные гены, для которых более 70% наборов бисульфитных прочтений показали метилирование, а в контрольных образцах — не более 20%. После этого все отобранные гены разделялись по типу продукта на мРНК, микроРНК и днРНК. Разбиение проводилось с помощью программы Grep, которая входит в состав стандартного дистрибутива Linux (<https://linux.die.net/man/1/grep>). Применен GEO Accession viewer. Таблицы для мРНК и микроРНК далее не рассматривались.

В экспериментальном исследовании использовали 93 образца первичных опухолей, 75 образцов парной гистологически неизменной ткани. 37 первичных опухолей были взяты от пациенток без метастазов, 56 — от больных с метастазами. Клинико-морфологические характеристики 93 образцов первичных опухолей представлены в табл. 1.

Анализ уровня метилирования генов днРНК проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Использован набор реактивов “qPCRmix-HS SYBR” по протоколу фирмы “Евроген”. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице [14]. Для сравнительного анализа эффективности амплификации также применялся локус *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице [14]. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для генов днРНК приведены в табл. 2. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве позитивного контроля 100%-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”).

Выделение РНК и получение кДНК проводили по методам, описанным ранее [17]. Анализ уровня экспрессии четырех днРНК выполнен методом количественной ПЦР в реальном времени в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по методу $\Delta\Delta C_t$ [18]. Изменения уровня днРНК менее чем в два раза ($|\Delta\Delta C_t| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений. Праймеры для анализа уровня четырех днРНК и контрольного гена *B2M* приведены в табл. 3. Наличие и размер продуктов ПЦР проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с

Таблица 1. Клинические и гистологические характеристики 93 образцов первичных опухолей больных РЯ

Клинико-гистологический параметр		N = 93
Гистологический тип	серозная аденокарцинома	67
	эндометриоидная аденокарцинома	12
	другие гистологические типы	14
Стадия	I	24
	II	18
	III	50
	IV	1
Размеры и распространенность опухоли	T1	24
	T2	18
	T3	51
Метастазирование	ЕСТЬ	56
	НЕТ	37
	N1	14
	M1	3
	метастазирование в большой сальник	42
	диссеминация по брюшине	38

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и условия МС-ПЦР

Ген днРНК	M/U	Последовательности праймеров	Длина, пн, темп. отж., °C
<i>GAS5</i>	M	MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG	185, 60
		MR: CGCCCGACGCCTTATCCC	
	U	UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG	179, 60
		UR: CAACACCTTATCCCCATCTTCTCCA	
<i>HOTAIR</i>	M	MF: CGGGTTTTTATTTTTTCGTTATTGCG	258, 54
		MR: CGACTACTCTCGCCAAATTTCACTACTTC	
	U	UF: TGGGTTTTTATTTTTTTGTTATTGTGTTATTTTG	258, 52
		UR: CAACTACTCTCACCAAATTTCACTACTTCACAC	
<i>LINC00472</i>	M	MF: AAGGCGTTTTTAAGTCGAGGGTA	224, 60
		MR: AACGACTCCGACAACACACC	
	U	UF: AAGGTGTTTTTAAGTTGAGGGTAAAG	228, 59
		UR: AACAACTCCAACAACACACCCAC	
<i>LINC00886</i>	M	MF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA	172, 60
		MR: CGCCGAATTACGCGACGAAA	
	U	UF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA	181; 60
		UR: CCTCACCAAATTACACAACAAAATCAACAC	
<i>SNHG17</i>	M	MF: GCGCGAAACGAGCGTA	168, 59
		MR: CGACGCCCTAACGTCTGAATA	
	U	UF: TTGGTGTGAAATGAGTGTA	170, 57
		UR: CAACACCCTAACATCAAATAACA	
<i>TUG1</i>	M	MF: CGGGTTTCGGTTTCGTGGTC	199, 60
		MR: CGACGAAAACGACAACAACACATAATT	
	U	UF: TGGTTTTTAAGGATTGGATTGAGGGTAG	159, 60
		UR: CAACAACAACAAAAACAACAACACATAAT	

Примечание. MF/UF – прямые праймеры к метилированному/неметилированному аллелю, MR/UR – обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю. Олигонуклеотиды подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <http://www.urogene.org/methprimer2/> с проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR (США). Для контрольного локуса ACTB использованы олигонуклеотиды из работы [14].

Таблица 3. Праймеры, условия ПЦР и размеры продукта ПЦР для 4 днРНК и контрольного гена

РНК	Последовательность праймеров	$T_{отж}, ^\circ\text{C}$	Размер, н.о.
<i>GAS5</i>	F: GAGCAAGCCTAACTCAAGCC R: TCAAGCCGACTCTCCATACCC	60	157
<i>HOTAIR</i>	F: CAGTGGGGAACTCTGACTCG R: GTGCCTGGTGCTCTCTTACC	60	94
<i>SNHG17</i>	F: GGGATCTGGGTTTGCTGATATT R: GTAGCCTCACTCTCCATTCTCT	62	89
<i>TUG1</i>	F: GTGCAGAAGCCCAGAGTAAA R: CCACGGTGGTAAAGGAAGATAG	62	152
<i>B2M</i>	F: TGACTTTGTACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	62	81

Примечание. Праймеры подбирали в программе Beacon Designer (Premier Biosoft International) и с использованием PrimerSelect, Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-primerselect.aspx>).

окрашиванием интеркалирующим красителем бромидом этидия.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22 и в программной среде R. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический *U* тест Манна–Уитни для независимых выборок. Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Корреляции между изменениями уровней метилирования и экспрессии оценивались с применением коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биоинформатический анализ базы данных GEO, направленный на отбор гиперметилируемых генов днРНК

При анализе базы данных GEO, входящей в среду NCBI (NCBI’s Gene Expression Omnibus, a public archive and resource for gene expression data), была поставлена задача отбора гиперметилируемых в опухолях яичников генов днРНК. Анализ данных полногеномного бисульфитного секвенирования ДНК из ткани яичника позволил определить несколько наборов генов днРНК, содержащих 2177 генов днРНК (библиотека GSE146556) и 3716 генов днРНК (библиотека GSE81228) [15, 16]. В результате удалось отобрать пять предположительно

гиперметилированных при РЯ генов: *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*. В исследование дополнительно включен ген *GAS5*, для которого ранее на выборке из 40 образцов РЯ нами были получены предварительные данные о его возможном частичном метилировании [14].

Затем, с помощью ресурса GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis [19]), был проведен анализ дифференциальной экспрессии 6 отобранных генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*). В результате анализа было показано, что для наиболее распространенного гистологического подтипа РЯ (серозной цистаденокарциномы яичника) характерно значительное снижение уровня экспрессии *GAS5* и *TUG1*, малозначимое снижение экспрессии *HOTAIR* и *LINC00472*, а также малозначимое повышение экспрессии *LINC00886* и *SNHG17*. Отмеченное снижение уровня экспрессии для генов *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *TUG1* указывало на возможную роль гиперметилирования в подавлении экспрессии данных генов, что характерно для генов-супрессоров в опухолях.

Изменения уровня метилирования шести генов днРНК в опухолях больных РЯ

По результатам МС-ПЦР проведен анализ уровня метилирования шести генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) в 93 образцах первичных опухолей и 75 образцах парной гистологически неизменной ткани. С применением непараметрического критерия

Манна–Уитни проведено сравнение уровня метилирования шести генов днРНК в образцах первичных опухолей и гистологически неизменной ткани. Статистически значимое ($p < 0.05$) повышение уровня метилирования наблюдается для всех 6 исследованных генов днРНК (рис. 1). Причем, для четырех генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* и *TUG1*) показано многократное (в 3–10 раз) и высоко значимое ($p < 0.001$) повышение уровня метилирования в первичных опухолях РЯ в сравнении с условной нормой. Повышение уровней метилирования двух других генов в (1.5–2 раза) также статистически значимо: *LINC00472* ($p = 0.016$) *SNHG17* ($p = 0.005$).

Следует отметить, что данные по гиперметилированию четырех генов днРНК (*LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) при РЯ ранее не были опубликованы (PubMed 12.10.2023).

На более тяжелых клинических стадиях (III–IV, 51 образец опухолей РЯ) в сравнении с менее тяжелыми стадиями (I–II, 42 образца опухолей РЯ) наблюдается дальнейшее статистически значимое

(в 2–4 раза, $p < 0.05$) повышение уровня метилирования пяти генов днРНК (кроме *SNHG17*), причем наиболее высоко значимое ($p < 0.001$) повышение уровней метилирования выявлено для трех генов днРНК (*GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*), что показано на рис. 2.

Аналогичный результат получен при сопоставлении данных для образцов, различающихся по размеру и степени распространенности рака (Т3, 52 образца, против Т1–Т2, 40 образцов): высоко значимое различие ($p < 0.001$) найдено для тех же трех генов (*GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*). Повышение уровня метилирования для генов *HOTAIR* и *TUG1* менее значимо ($p = 0.03$), для *SNHG17* – не выявлено.

Анализ образцов первичных опухолей РЯ от пациенток с метастазами (56 образцов) и без метастазов (37 образцов) выявил высоко значимую связь повышенного уровня метилирования с наличием метастазирования для генов *LINC00472* ($p < 0.001$) и *HOTAIR* ($p = 0.002$). Для трех других генов днРНК значимость различия уровней метилирования

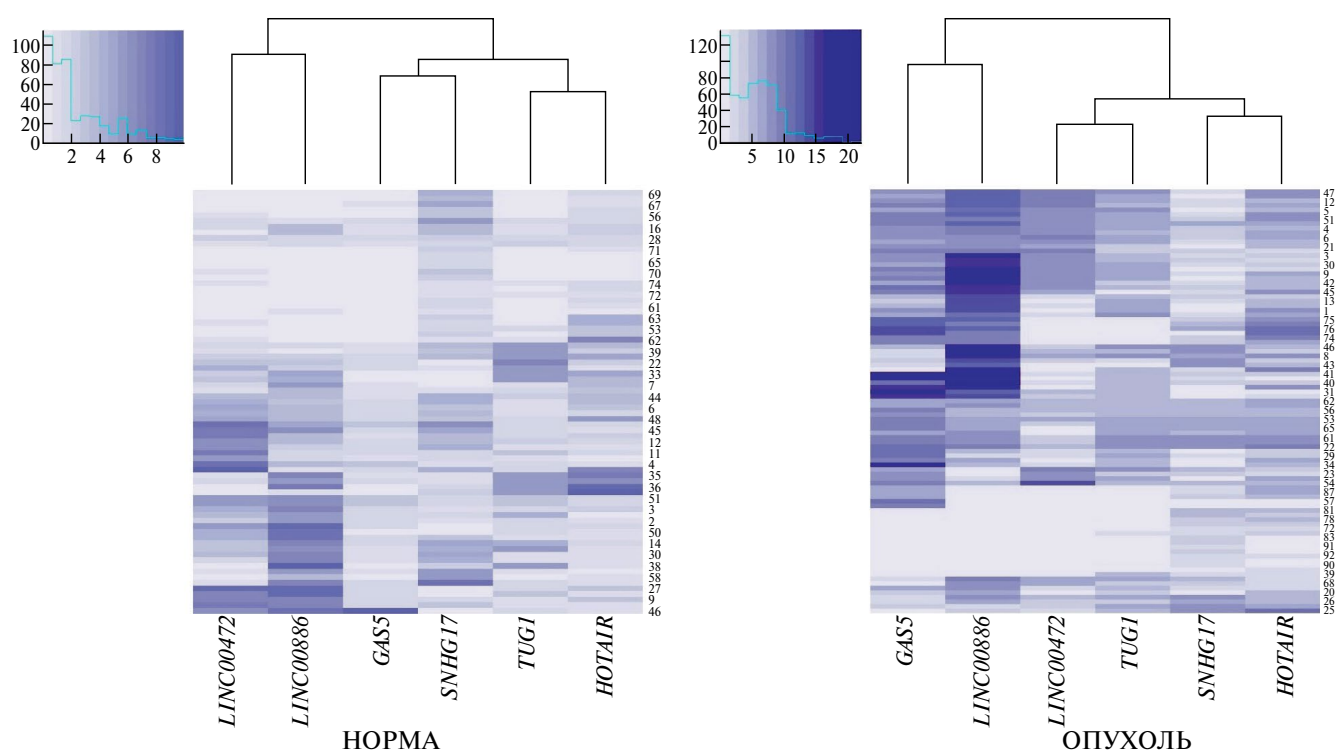


Рис. 1. Сравнение уровней метилирования шести генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) в 93 образцах опухоли РЯ и в 75 парных образцах условной нормы; рассчитано с применением непараметрического критерия Манна–Уитни, показано в виде тепловой карты.

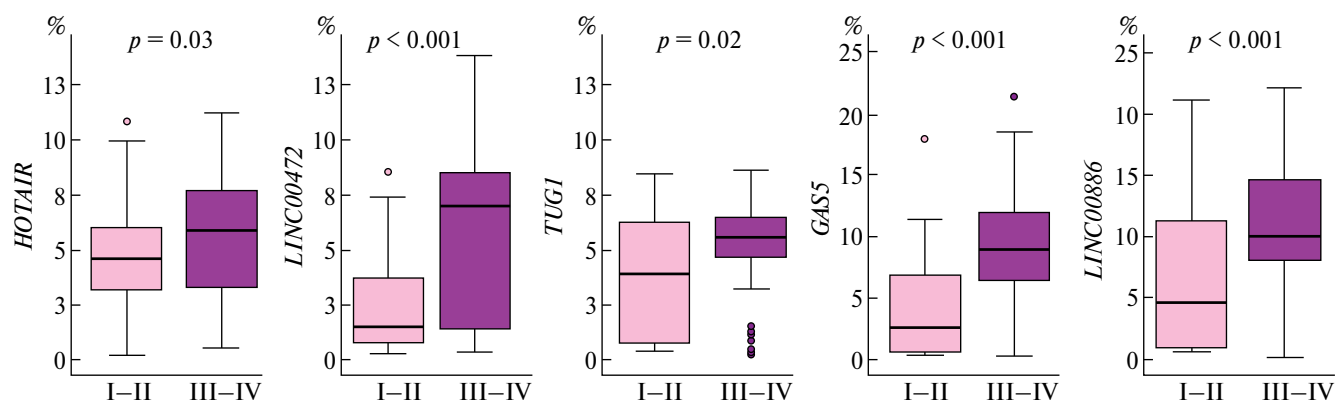


Рис. 2. Повышение уровня метилирования пяти генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886* и *TUG1*) на более поздних клинических стадиях (III–IV (51 образец) против I–II (42 образца)). На оси абсцисс – стадия заболевания.

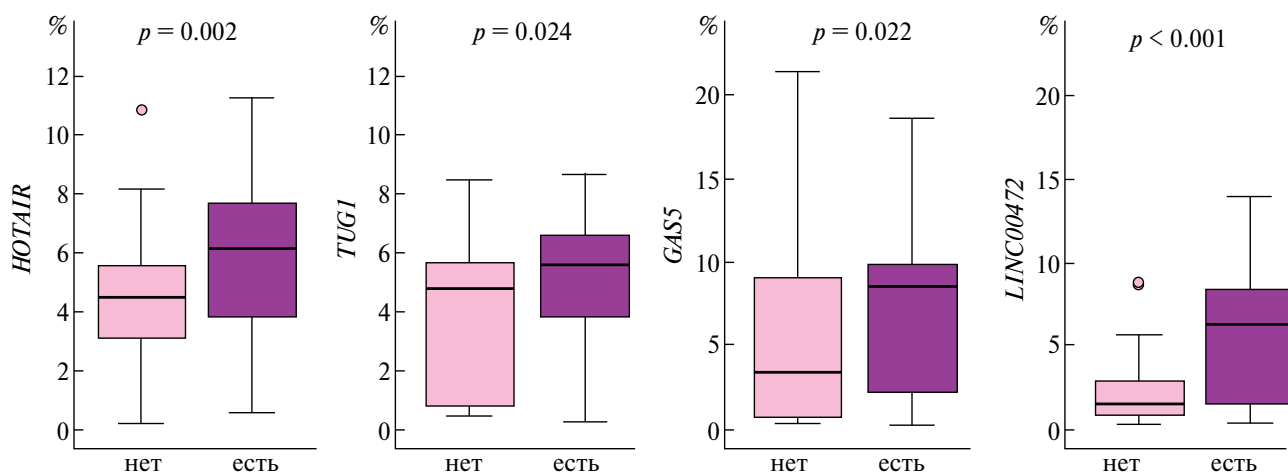


Рис. 3. Повышение уровня метилирования генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *TUG1*) в первичных опухолях больных РЯ с метастазами (56 образцов) в сравнении с образцами опухолей больных без метастазов (37 образцов). По оси абсцисс – наличие или отсутствие метастазов.

в первичных опухолях между группами пациентов с метастазами и без таковых составили: *GAS5*, $p = 0.022$; *TUG1*, $p = 0.024$; для гена *SNHG17* различие не значимо (рис. 3).

Влияние aberrантного метилирования на изменение уровня экспрессии генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1*

Если для генов днРНК *GAS5*, *LINC000472*, *LINC000886* имелись данные о влиянии метилирования на экспрессию в некоторых видах рака, то

для генов *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* такие данные полностью отсутствовали (PubMed, 30.09.2023). В связи с этим исследовано изменение уровня экспрессии для четырех днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* в образцах РЯ относительно условной нормы; исследование выполнено на общей выборке из 36–53 образцов РЯ, использованных также в анализе aberrантного метилирования (рис. 4).

Наблюдается незначительное снижение уровня экспрессии днРНК *GAS5* (14/53 – 26%, против

18/53 – 34%, в 1.3 раза) в опухолях больных РЯ, высоко значимое снижение уровня экспрессии днРНК *HOTAIR* (8/36 – 22%, против 26/36 – 72%, в 3.2 раза, $p < 0.001$), а также довольно значительное повышение уровня экспрессии днРНК *SNHG17* (18/36 – 55%, против 12/36 – 33%, в 1.5 раза) и незначительное повышение днРНК *TUG1* (9/45 – 20%, против 11/45 – 24%, в 1.2 раза). Многократное и высоко значимое снижение уровня экспрессии гена *HOTAIR* указывает на возможную роль метилирования в подавлении его экспрессии в опухолях РЯ. Полученные данные не исключают возможность вовлеченности метилирования в дерегуляцию экспрессии генов *GAS5* и *TUG1*. Однако значительное (в 1.5 раза) повышение уровня экспрессии днРНК *SNHG17* не согласуется с возможным участием выявленного гиперметилирования в подавлении экспрессии этой днРНК. Сопоставление результатов по изменениям уровней метилирования и экспрессии для этих четырех днРНК показало статистически значимую корреляцию только для гена *GAS5* ($r_s = -0.47$, $p < 0.001$), исследованного на большей выборке образцов (рис. 5).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные подтверждают функциональную роль метилирования в подавлении экспрессии гена *GAS5*. При этом можно также предполагать, что метилирование может участвовать в регуляции генов *HOTAIR* и *TUG1*, но не гена *SNHG17*, который отличается наиболее повышенной экспрессией как по данным ресурса GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), так и по результатам нашего экспериментального исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ

С применением биоинформатического анализа было отобрано шесть генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*, потенциально метилируемых при РЯ, из которых пять (*HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*) определены при анализе базы данных NCBI GEO. Чтобы оценить роль возможного участия метилирования в регуляции экспрессии этих генов в опухоли была использована платформа GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>). Результаты анализа позволили первично оценить уровень экспрессии каждого гена в опухоли яичника относительно нормальной ткани. Так, в отличие от рака легкого, почки и РМЖ, при серозной цистаденокарциноме яичника (доминирующем типе РЯ) выявлено сильное снижение уровня экспрессии днРНК *GAS5* и *TUG1*, которое могло быть вызвано aberrантным метилированием CpG-островков в промоторных участках этих генов. Кроме того, в международных исследованиях имеются единичные работы о

характере метилирования этих генов и влиянии метилирования на потенциал экспрессии. Так, согласно литературным источникам, получены данные о роли гиперметилирования в подавлении экспрессии гена *GAS5* в опухолях желудка, а также в меланоме и злокачественных опухолях молочной железы [20–22]. Таким образом, в настоящем исследовании поставлена задача выяснить значимость метилирования шести генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) в развитии и прогрессии опухолей яичников, включая развитие метастазов, а также в дерегуляции экспрессии кодируемых ими днРНК. Проведенный анализ метилирования шести отобранных генов днРНК с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной МС-ПЦР показал статистически значимое повышение уровня метилирования всех шести исследованных генов: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*.

Сравнение уровней метилирования генов в образцах РЯ на разных клинических стадиях и в зависимости от размеров и распространенности рака показало дальнейшее возрастание уровня метилирования с прогрессией РЯ для пяти генов днРНК, кроме *SNHG17*. Для четырех генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *TUG1*) также установлена связь aberrантного метилирования с метастазированием РЯ (в лимфатические узлы, брюшину или другие органы).

Проведенный анализ изменения уровня экспрессии днРНК *SNHG17* в парных образцах РЯ позволил определить значимое повышение уровня ее экспрессии в опухоли. При этом связи гиперметилирования с экспрессией гена *SNHG17* выявлено не было. Характерно, что именно для гена этой днРНК не обнаружено также связи метилирования с какими-либо параметрами прогрессии РЯ (стадией, распространенностью, метастазированием). На основании этих результатов можно заключить, что aberrантное метилирование гена *SNHG17* не участвует в дерегуляции экспрессии этой днРНК. Этот результат согласуется с данными литературы об онкогенных свойствах днРНК *SNHG17*, в частности в патогенезе РЯ [23].

Для гена днРНК *GAS5* выявлено гиперметилирование при раке желудка, меланоме и в других видах рака [20–22]. В настоящей работе установлено гиперметилирование гена *GAS5* на представительной выборке образцов РЯ и впервые показана статистически значимая отрицательная корреляция между уровнями метилирования и экспрессии, подтверждающая участие aberrантного метилирования в подавлении экспрессии этой днРНК. Полученные нами данные согласуются с данными о супрессорной функции днРНК *GAS5* в опухолях разных локализаций, включая РЯ [24, 25].

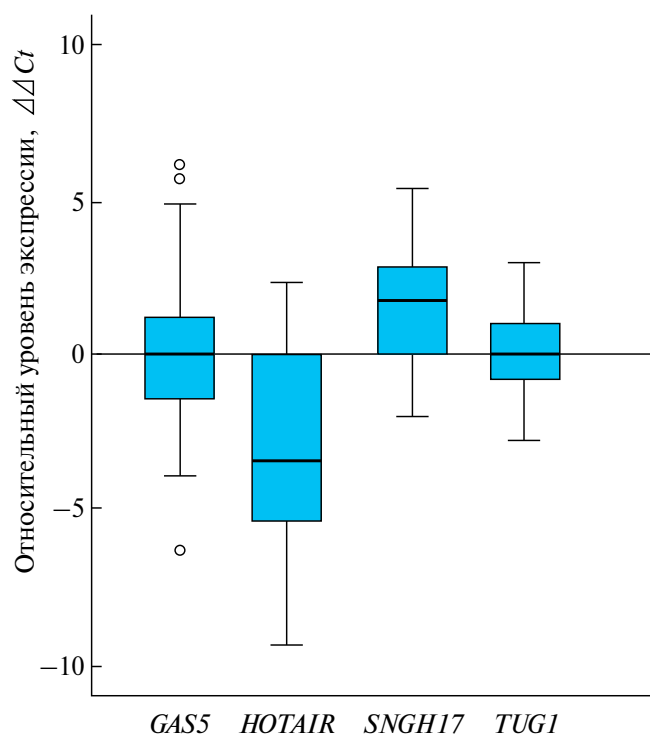


Рис. 4. Профиль изменения уровня экспрессии днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* на выборке из 36–53 образцов РЯ относительно условной нормы.

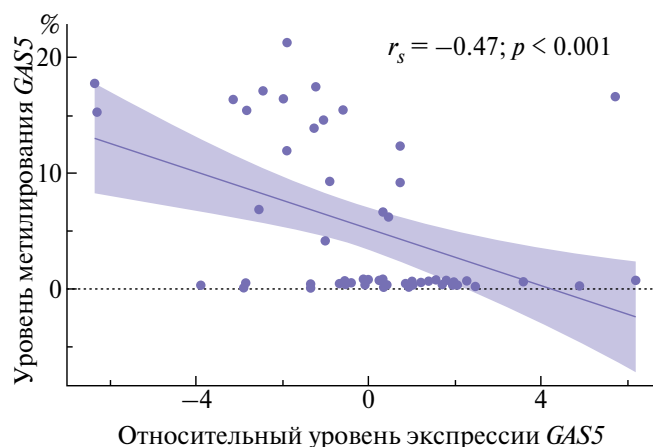


Рис. 5. Отрицательная корреляция между изменением уровней метилирования и экспрессии гена *GAS5* (в 53 парных образцах РЯ); на рисунке приведен коэффициент корреляции Спирмена: $r_s = -0.47$, $p < 0.001$.

Результат о гиперметилировании гена *HOTAIR* согласуется с данными о выявленном ранее aberrантном метилировании этого гена в клетках и тканях РЯ [26]. Снижение уровня экспрессии одновременно с увеличением уровня метилирования гена *HOTAIR*, и связь гиперметилирования с прогрессией РЯ, в том числе с клинической стадией, степенью распространённости и наличием метастазирования, позволяют предполагать участие процесса aberrантного метилирования гена *HOTAIR* в регуляции его экспрессии и супрессорную роль этой днРНК при РЯ.

Для днРНК *TUG1* ранее была показана повышенная экспрессия и онкогенные свойства во многих опухолях [27, 28]. Однако обнаруженное нами в настоящей работе многократное и статистически значимое повышение уровня метилирования гена *TUG1* в первичных опухолях РЯ, а также дальнейшее возрастание уровня метилирования с прогрессией РЯ (учитывая стадию, размеры и распространённость, а также метастазирование) позволяют предположить функциональное значение метилирования в инактивации этой днРНК и в патогенезе РЯ. С этим предположением согласуются данные сервиса GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) о сильном снижении уровня экспрессии днРНК *TUG1* при серозной цистаденокарциноме яичника (доминирующем типе РЯ) в отличие от рака легкого, почки и РМЖ, при которых наблюдается повышенная экспрессия.

Для межгенной днРНК *LINC00472* ранее была установлена роль гиперметилирования в регуляции её экспрессии в патогенезе рака молочной железы и желудка, а также супрессорные свойства в патогенезе некоторых видов рака [29, 30]. Однако повышенный уровень метилирования гена *LINC00472* в опухолях больных РЯ, а также данные о дальнейшем возрастании метилирования этого гена с повышением стадии и появлением метастазов выявлены нами впервые. Для гена *LINC00886* также имелись данные литературы о роли гиперметилирования в снижении экспрессии этой днРНК при раке гортани и при плоскоклеточном раке пищевода и в подавлении эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [31, 32]. Однако aberrантное метилирование гена *LINC00886* в опухолях больных РЯ, а также данные о связи гиперметилирования этого гена с прогрессией РЯ обнаружены нами впервые. Наш результат вместе с данными литературы позволяет предполагать, что aberrантное метилирование генов *LINC00472* и *LINC00886*, выявленное в настоящей работе в РЯ, вовлечено в дерегуляцию их экспрессии в РЯ.

Для оценки функциональной значимости шести исследованных днРНК, мы провели предварительный биоинформатический скрининг мРНК-мишеней, позитивно коррелирующих с

днРНК, с применением NCBI GEO (NCBI's Gene Expression Omnibus). Взята библиотека данных GSE211669 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE211669>) с результатами для 130 пациентов с диагнозом РЯ. По данным этого анализа, днРНК *GAS5* и *TUG1* наиболее задействованы в регуляции белковых генов. *GAS5* может прямо или опосредованно участвовать в позитивной регуляции 196 мРНК, а *TUG1* – 531 мРНК, *SNHG17* – 53 мРНК, *LINC00472* – 21 мРНК, *HOTAIR* – 4 мРНК и *LINC00886* – 2 мРНК ($r_s \geq 0.5$, $p \leq 10^{-9}$).

По данным PubMed (30.09.2023), к наиболее изученным днРНК в отношении патогенеза рака, и в частности РЯ, относятся именно *GAS5* (455 работ и 25 работ при РЯ) и *TUG1* (342 работы и 15 работ при РЯ). *GAS5* участвует в подавлении РЯ через активацию PTEN, Sprouty homolog 2 (SPRY2) и других онкосупрессоров [24, 33]. *GAS5* может подавлять инвазию и метастазирование рака поджелудочной железы и рака легкого, ингибируя ЭМП и стволовость раковых клеток [34, 35]. Эта днРНК выступает в роли супрессора в РМЖ, колоректальном раке, раке шейки матки, и вообще может подавлять до 20 видов рака, хотя при раке печени функционирует как онкоген [36]. В отношении *TUG1* опубликованные данные свидетельствуют об онкогенных функциях этой днРНК, например, через активацию ЭМП [28], хотя могут быть исключения, как для *GAS5* при раке печени. И можно предположить, что ингибирование гена *TUG1* в РЯ, по крайней мере частично, осуществляется за счет гиперметилирования, и что эта днРНК способна выступать супрессором при РЯ.

По итогам настоящего исследования можно утверждать, что процесс гиперметилирования генов *GAS5*, *LINC00472* и *LINC00886* в опухоли яичников является значимым регулятором экспрессии этих днРНК, что подтверждает супрессорный характер этих трех днРНК. При этом роль этого процесса для гена *SNHG17* как фактора регуляции экспрессии не значима, а определение роли гиперметилирования в дерегуляции генов *TUG1* и *HOTAIR* требует дальнейших исследований.

Интересно отметить, что гиперметилирование промоторного участка гена днРНК *LINC00473*, выявленное недавно в ДНК свободной от клеток плазмы больных колоректальным раком, предложено для ранней неинвазивной диагностики этого вида рака [37]. Обнаруженное нами гиперметилирование группы генов днРНК также открывает перспективы в разработке новых тестов для ранней диагностики РЯ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант РНФ №20-15-00368П).

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института

общей патологии и патофизиологии (18.04.2023, № 8-23-2).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Канрин А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, 2022. 252 с.
2. Vogell A., Evans M.L. Cancer screening in women // *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 2019. V. 46. № 3. P. 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2019.04.007>
3. Wei J.W., Huang K., Yang C., Kang C.S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review) // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 1. P. 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
4. Hombach S., Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 937. P. 3–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1
5. Baek D., Villén J., Shin C. et al. The impact of microRNAs on protein output // *Nature.* 2008. V. 455. № 7209. P. 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
6. Sanchez Calle A., Kawamura Y., Yamamoto Y. et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer // *Cancer Sci.* 2018. V. 109. № 7. P. 2093–2100. <https://doi.org/10.1111/cas.13642>
7. Буре И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Длинные некодирующие РНК и их роль в онкогенезе // *Мол. Биология* 2018. Т. 52. № 6. С. 907–920. <https://doi.org/10.1134/S0026898418060034>
8. Zhang X., Wang W., Zhu W. et al. Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 22. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>
9. Moutinho C., Esteller M. MicroRNAs and epigenetics // *Adv. Cancer Res.* 2017. V. 135. P. 189–220. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.06.003>
10. Ma L., Li C., Yin H. et al. The mechanism of DNA methylation and miRNA in breast

- cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 11.
<https://doi.org/10.3390/ijms24119360>.
11. Sheng X., Li J., Yang L. *et al.* Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer // *Oncol. Rep.* 2014. V. 32. № 1. P. 277–285.
<https://doi.org/10.3892/or.2014.3208>
 12. Gokulnath P., de Cristofaro T., Manipur I. *et al.* Long non-coding RNA HAND2-AS1 acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11.
<https://doi.org/10.3390/ijms21114059>
 13. Di Fiore R., Suleiman S., Drago-Ferrante R. *et al.* LncRNA *MORT (ZNF667-AS1)* in cancer – is there a possible role in gynecological malignancies? // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15.
<https://doi.org/10.3390/ijms22157829>
 14. Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Иванова Н.А. и др. Гиперметилирование генов новых длинных некодирующих РНК в опухолях яичников и метастазах: двойственный эффект // *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2021. Т. 171. № 3. С. 370–374.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05230-3>
 15. Zhang W., Klinkenbiel D., Barger C.J. *et al.* Global DNA hypomethylation in epithelial ovarian cancer: Passive demethylation and association with genomic instability // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 3.
<https://doi.org/10.3390/cancers12030764>
 16. Klinkenbiel D., Zhang W., Akers SN *et al.* DNA methylome analyses implicate fallopian tube epithelia as the origin for high-grade serous ovarian cancer // *Mol Cancer Res.* 2016. V. 14. № 9. P. 787–794.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0097>
 17. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenenny A.M. *et al.* DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression // *Gene*. 2017. V. 604. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>
 18. Pronina I.V., Uroshlev L.A., Moskovtsev A.A. *et al.* Dysregulation of lncRNA–miRNA–mRNA interactome as a marker of metastatic process in ovarian cancer // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 4.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10040824>
 19. Tang Z., Kang B., Li C. *et al.* GEPIA2: An enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis // *Nucl. Ac. Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W556–W560.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
 20. Zhang N., Wang A.Y., Wang X.K. *et al.* GAS5 is down-regulated in gastric cancer cells by promoter hypermethylation and regulates adriamycin sensitivity // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016. V. 20. № 15. P. 3199–3205
 21. Zhang Y.J., Xie R., Jiang J. *et al.* 5-Aza-dC suppresses melanoma progression by inhibiting GAS5 hypermethylation // *Oncol. Rep.* 2022. V. 48. № 1.
<https://doi.org/10.3892/or.2022.8334>
 22. Селезнева Ал. Д., Филиппова Е.А., Селезнева Ан. Д. и др. Гиперметилирование группы генов длинных некодирующих РНК в развитии и прогрессии рака молочной железы // *Бюлл. Эксп. Биол. и Мед.* 2022. Т. 173. № 6. С. 754–758.
 23. Wang W., Yu S., Li W. *et al.* Silencing of lncRNA SNHG17 inhibits the tumorigenesis of epithelial ovarian cancer through regulation of miR-485-5p/AKT1 axis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. V. 637. P. 117–126.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.091>
 24. Dong Q., Long X., Cheng J. *et al.* LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer progression by targeting the miR-96-5p/PTEN axis // *Ann. Transl. Med.* 2021. V. 9. № 24.
<https://doi.org/10.21037/atm-21-6134>
 25. Lin G., Wu T., Gao X. *et al.* Research Progress of Long Non-Coding RNA GAS5 in Malignant Tumors // *Front Oncol.* 2022. V. 12. № 846497.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.846497>
 26. Teschendorff A.E., Lee S.H., Jones A. *HOTAIR* and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer // *Genome Med.* 2015. V. 7. № 108.
<https://doi.org/10.1186/s13073-015-0233-4>
 27. Shen X., Hu X., Mao J. *et al.* The long noncoding RNA *TUG1* is required for TGF- β /TWIST1/EMT-mediated metastasis in colorectal cancer cells // *Cell. Death. Dis.* 2020. V. 11. № 1. № 65.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2254-1>
 28. Kuang D., Zhang X., Hua S. *et al.* Long non-coding RNA *TUG1* regulates ovarian cancer proliferation and metastasis via affecting epithelial-mesenchymal transition. // *Exp. Mol. Pathol.* 2016. V. 101. № 2. P. 267–273.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.09.008>
 29. Shen Y., Wang Z., Loo L.W. *et al.* *LINC00472* expression is regulated by promoter methylation and associated with disease-free survival in patients with grade 2 breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2015. V. 154. № 3. P. 473–482.
<https://doi.org/10.1007/s10549-015-3632-8>
 30. Tsai K.W., Tsai C.Y., Chou N.H. *et al.* Aberrant DNA hypermethylation silenced lncRNA expression in gastric cancer // *Anticancer Res.* 2019. V. 39. № 10. P. 5381–5391.
<https://doi.org/10.21873/anticancer.13732>
 31. Lan L., Cao H., Chi W. *et al.* Aberrant DNA hypermethylation-silenced *LINC00886* gene accelerates malignant progression of laryngeal carcinoma // *Pathol. Res. Pract.* 2020. V. 216. № 4.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.152877>
 32. Dong Z., Yang L., Lu J. *et al.* Downregulation of *LINC00886* facilitates epithelial-mesenchymal transition through SIRT7/ELF3/miR-144 pathway in esophageal squamous cell carcinoma // *Clin. Exp.*

- Metastasis. 2022. V. 39. № 4. P. 661–677.
<https://doi.org/10.1007/s10585-022-10171-w>
33. Ma N., Li S., Zhang Q. *et al.* Long non-coding RNA *GAS5* inhibits ovarian cancer cell proliferation via the control of microRNA-21 and *SPRY2* expression // Exp. Theor. Med. 2018. V. 16. № 1. P. 73–82.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6188>
34. Liu B., Wu S., Ma J. *et al.* lncRNA *GAS5* reverses EMT and tumor stem cell-mediated gemcitabine resistance and metastasis by targeting miR-221/SOCS3 in pancreatic cancer // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2018. V. 13. P. 472–482.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.09.026>
35. Zhu L., Zhou D., Guo T. *et al.* lncRNA *GAS5* inhibits invasion and migration of lung cancer through influencing EMT process // J. Cancer. 2021. V. 12. № 11. P. 3291–3298. <https://doi.org/10.7150/jca.56218>
36. Yang X., Xie Z., Lei X., Gan R. Long non-coding RNA *GAS5* in human cancer // Oncol. Lett. 2020. V. 20. № 3. P. 2587–2594.
<https://doi.org/10.3892/ol.2020.11809>
37. Ruiz-Bañobre J., Rodriguez-Casanova A., Costa-Fraga N. *et al.* Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the *LINC00473* promoter in plasma cell-free DNA // Clin. Epigenetics. 2022. V. 14. № 86. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01302-x>

Hypermethylation in Ovarian Cancer of Long Non-Coding RNA Genes: *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *TUG1*

A. M. Burdennyi^{1, *}, S. S. Lukina¹, L. A. Uroshlev², E. A. Filippova¹,
I. V. Pronina¹, M. V. Fridman², K. I. Zhordaniya³, T. P. Kazubskaya³,
N. E. Kushlinskii³, V. I. Loginov^{1, 4}, E. A. Braga^{1,4, **}

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

²*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*

³*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia*

⁴*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia*

*e-mail: burdennyi@gmail.com

**e-mail: eleonora10_45@mail.ru

Recently, more and more data have been accumulating indicating the role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the regulation of biological processes in cells, as well as in the mechanisms of cancer development and progression. Aberrant methylation of promoter regions of both protein genes and lncRNA genes can disrupt their expression and functional activity. Using bioinformatics databases, six lncRNA genes (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* and *TUG1*) with CpG islands, differentially expressed and presumably hypermethylated in tumors of patients with ovarian cancer (OC) were selected. A statistically significant ($p < 0.05$) increase in the methylation level in tumours was demonstrated in a sample of 93 OC specimens using methylation-specific real-time PCR assay. Moreover, for the genes *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* and *TUG1*, hypermethylation in OC was detected for the first time. 5 genes (except *SNHG17*) showed a further increase in methylation levels at a more advanced stage, and 4 genes (except *SNHG17* and *LINC00886*) showed a significant association with metastasis. Using real-time RT-PCR, differential changes in the expression level of the *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* and *TUG1* genes and a significant correlation of methylation with expression for the *GAS5* gene were shown. Thus, hypermethylation associated with the progression and/or development of OC was detected for six lncRNA genes, which is important for elucidating the epigenetic processes involved in the pathogenesis of OC and can be used as new biomarkers of OC.

Keywords: long non-coding RNA genes, *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*, aberrant methylation, ovarian cancer.