

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК: *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR* ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

© 2024 г. С. С. Лукина^а, А. М. Бурдённый^{а, *}, Е. А. Филиппова^а, Л. А. Урошлев^б, И. В. Пронина^а, Н. А. Иванова^а, М. В. Фридман^б, К. И. Жордания^с, Т. П. Казубская^с, Н. Е. Кушлинский^с, В. И. Логинов^{а, d, *}, Э. А. Брага^{а, d, **}

^аНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

^бИнститут общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^сНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

^dМедико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

*e-mail: burdennyu@gmail.com

**e-mail: eleonora10_45@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Рак яичников развивается бессимптомно и не диагностируется вплоть до поздних стадий, что повышает уровень летальности от этого заболевания. Изучение механизмов регуляции генов с участием длинных некодирующих РНК (днРНК) и идентификация генов таких РНК, ингибируемых посредством метилирования промоторных участков, открывает новые перспективы в диагностике и терапии рака яичников. Методом метил-специфичной ПЦР в реальном времени определено изменение уровня метилирования группы генов днРНК (*PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*) в 122 образцах. С применением непараметрического критерия Манна–Уитни показано статистически значимое ($p < 0.001$) повышение уровня метилирования этих пяти генов днРНК при раке яичников. Установлена статистически значимая ($p < 0.05$) корреляция уровня метилирования генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* со стадией опухолевого процесса, степенью дифференцировки и наличием метастазов. С применением ОТ-ПЦР в реальном времени выявлено снижение уровня экспрессии *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* и показана значимая корреляция метилирования с экспрессией *SNHG6* и *TINCR* ($r_s \leq -0.5$, $p < 0.001$). Таким образом, определены новые гены днРНК, которые можно рассматривать как потенциальные эпигенетические маркеры рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников, длинные некодирующие РНК, гены, промоторные участки, метилирование, *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*

DOI: 10.31857/S0026898424030059, EDN: JCWWHN

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников (РЯ) — является одним из наиболее летальных злокачественных новообразований и причина ежегодной смерти более 200000 женщин в мире [1, 2]. РЯ развивается бессимптомно и не диагностируется вплоть до поздних стадий с обширным метастазированием и устойчивостью к химиотерапии. Кроме лимфогенного и гематогенного типов метастазирования, для РЯ характерна также диссеминация по брюшине с образованием асцита, что повышает уровень летальности. Для ранней диагностики РЯ необходимо знать механизмы и факторы, участвующие в развитии и прогрессии этого вида рака, а также его маркеры и терапевтические мишени.

Важную роль в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и сигнальных путей в онкогенезе играют некодирующие

РНК (нкРНК) [3–5]. В число этих РНК входят длинные некодирующие РНК (днРНК) протяженностью более 200 нуклеотидов, которые взаимодействуют с ДНК, РНК или белками, образуют с ними сложные структуры и участвуют в ремоделировании хроматина, модуляции экспрессии генов и передаче сигналов [5–7].

В настоящее время проводится интенсивный функциональный анализ некодирующих областей генома и их транскриптов, в том числе регуляторных микроРНК и днРНК, а также эпигенетических модификаций, которые управляют регуляцией генома [8]. К таким модификациям относятся и aberrантное метилирование промоторных CpG-островков генов. Изучение участков дифференциального метилирования, способных влиять на изменения экспрессии гена, позволяет лучше понять механизмы регуляции генов, кодирующих

белки, микроРНК и днРНК [8, 9]. Так, гиперметилирование играет критическую роль в дерегуляции супрессорных и других функций ряда генов днРНК, таких как MEG3, TP53-TG1, HAND2-AS1 и др. [10–12].

Цель данной работы — найти новые гены днРНК, экспрессия которых в РЯ регулируется метилированием, и оценить возможную связь аберрантного метилирования этих генов с прогрессией и метастазированием РЯ.

С этой целью нами проведен отбор группы генов днРНК, содержащих, согласно базам данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, <http://www.urogene.org/methprimer2/>), CpG-островки и дифференциально регулируемых в РЯ. В исследование вошли пять генов днРНК: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*, отобранных также путем анализа базы данных GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), согласно которой экспрессия этих генов снижена в серозной цистаденокарциноме яичника, доминирующем типе РЯ. Так, значимо снижена экспрессия как генов *SNHG1* и *SNHG12* ($p < 0.01$), так и генов *SNHG6* и *TINCR*. Уровень экспрессии *PLUT* мало изменяется в РЯ и также несколько снижается (по данным GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)).

Кроме того, нами проведен пилотный биоинформатический скрининг данных полногеномного бисульфитного секвенирования генома РЯ из базы NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO, a public archive and resource for gene

expression data). Был использован опыт GSE81228 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE81228>), который включал данные для 27 образцов РЯ. Далее с помощью языка программирования R были отобраны гены, метилирование которых выявлено в 70% и более наборов бисульфитных прочтений в опухолях РЯ, а в контрольных образцах — менее чем в 20%.

Согласно анализу данных NCBI GEO, гены *PLUT* и *SNHG12* относятся к генам, гиперметилированным при РЯ. Учитывая существенное снижение экспрессии генов днРНК *SNHG1*, *SNHG6* и *TINCR* при серозной цистаденокарциноме яичника (согласно данным GEPIA2), можно предположить участие эпигенетической модификации в дерегуляции экспрессии этих трех генов, имеющих CpG-островки. В итоге для экспериментального исследования были отобраны пять генов днРНК (*PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*), предположительно гиперметилированных в РЯ.

Следует подчеркнуть практически полное отсутствие данных о роли метилирования ДНК этих генов в патогенезе РЯ, за исключением недавних работ о вовлеченности *SNHG12* и *TINCR* в эпигенетические механизмы [13, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы РЯ собраны и морфологически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Таблица 1. Клинические и гистологические характеристики образцов первичного рака яичников

Клинико-гистологический параметр		Выборка	
		N = 122	N = 93
Гистологический тип	Серозная аденокарцинома	85	68
	Эндометриоидная аденокарцинома	15	12
	Другие гистологические типы	22	13
Стадия	I	26	24
	II	19	17
	III	68	50
	IV	9	2
Степень дифференцировки	G1	25	11
	G2	31	28
	G3	48	43
	Пограничные	18	11
Метастазирование	ЕСТЬ	79	56
	НЕТ	43	37
	N1	21	11
	M1	9	2
	Метастазы в большой сальник	61	42
	Диссеминация по брюшине	45	35
	Перитонеальные метастазы суммарно	69	50

Примечание. Гены *SNHG6* и *TINCR* анализировали в 122 образцах опухолей, а гены *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG12* — в 93 образцах.

Минздрава России. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности; получено информированное согласие больных. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации [15]. Исследовали образцы РЯ, полученные от больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Все опухоли были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [16, 17]. Образцы с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) отбирали с помощью дополнительного гистологического анализа микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилин-эозином. Образцы тканей хранили при -70°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора T10 basic ULTRA-TURRAX (“IKA”, Китай).

В исследовании использовали 122 образца РЯ, 105 образцов парной гистологически неизменной ткани яичника и 48 макроскопических перитонеальных метастазов. Часть исследования выполнена на меньшей выборке из 93 образцов РЯ, 75 образцов парной гистологически неизменной ткани яичника и 29 перитонеальных метастазов. Клинико-морфологические характеристики образцов представлены в табл. 1. Выделение ДНК и РНК, получение кДНК проводили, как описано ранее [18].

Уровень метилирования генов днРНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР). Набор реактивов qPCRMix-HS SYBR использовали согласно рекомендациям фирмы (“Евроген”, Россия). Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Олигонуклеотиды и условия проведения ПЦР для генов днРНК приведены в табл. 2.

Таблица 2. Праймеры и условия МС-ПЦР, использованные в данной работе

Ген днРНК	M/U	Праймер, нуклеотидная последовательность	Длина, п.н.	$T_{\text{отж}}, ^{\circ}\text{C}$
<i>PLUT</i>	М	MF: CGGGGATTTGGTATTGTGTGGC	201	60
		MR: CTAACCTAACCTCTTAATACGACCAACCA		
	U	UF: TGTTGGAATGTGTATGGGTTTTGTAAAGTT	339	61
		UR: CACAAATACCTAACCTAACCTCTTAATACAACCA		
<i>SNHG1</i>	М	MF: CGGCGATCGAGGTTTTAGGA	210	60
		MR: ACTAACTCACCGACCGCATT		
	U	UF: TGGTGATTGAGGTTTTAGGA	210	55
		UR: ACTAACTCACCAACCACATT		
<i>SNHG6</i>	М	MF: TTGAGTTATCGCGTTCGGTTT	295	61
		MR: CTCTTCCGATACGCGACCC		
	U	UF: CTCTTCCAATACACAACCC	295	58
		UR: CAAAACCATAAACACCCTCC		
<i>SNHG12</i>	М	MF: CGCGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGGAAGAGATAAG	239	60
		MR: CCCGACGCTAAACCCACGC		
	U	UF: TGTGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGGAAGAGATAAG	245	56
		UR: TCAATACCCAACACTAAACCCACAC		
<i>TINCR</i>	М	MF: GCGGACGAGGCGTTGTTGTTAT	193	60
		MR: CGCTAACGAACAACAACACCGAAC		
	U	UF: GTGGATGAGGTGTTGTTGTTATTGTTGATT	194	60
		UR: TCACTAACAAACAACAACACCAAACCATC		

Примечание. MF/UF и MR/UR – прямые и обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю соответственно. 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).

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

РНК	Праймеры, нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Размер, п. н.
SNHG12	F: TCTGGTGCATCGAGGACTTCC R: AGCATGCTGTTGTTTCTACCTAA	60	157
SNHG6	F: GCGAGGTGCAAGAAAGCC R: TGCTGCATGCCACACTTGA	60	94
TINCR	F: TGACAGGGCCCAAGGGGAAGTATT R: TGTGGCCCAAGTCAAGGATACAT	60	152
B2M	F: TGAAGTGTGTCACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	60	81

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

Результаты определения уровня метилирования анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$, как описано нами ранее [18]. В качестве контрольного локуса использовали локус *ACTB*, полученный с помощью олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве положительного контроля 100% метилирования использовали препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Результаты метилирования оценивали с помощью индекса метилирования (ИМ) согласно [19, 20]. Значение ИМ рассчитывали для каждого образца в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System.

Уровни экспрессии четырех днРНК анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. Данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ [18]. Изменение уровня днРНК менее чем в 2 раза ($|\Delta\Delta C_t| \leq 2$) принимали за отсутствие изменений. Праймеры для анализа уровня экспрессии трех днРНК и контрольного гена *B2M* приведены в табл. 3. Наличие продуктов ПЦР и их размер проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием интеркалирующим красителем бромидом этидия.

Статистическая обработка. Полученные результаты анализировали с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22 и в среде программирования R. Значимость различий между исследуемыми группами оценивали, используя непараметрический U тест Манна–Уитни для независимых выборок. Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. При анализе связи уровней метилирования со степенью злокачественности (дифференцировки) применяли критерий Краскала–Уоллиса (для определения статистически значимых различий между медианами трех независимых групп: G1–G2–G3). Корреляции между изменениями уровней

метилирования и экспрессии оценивали с применением коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методом МС-ПЦР в реальном времени нами определен уровень метилирования пяти генов днРНК: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG12* в 93 образцах РЯ, *SNHG6* и *TINCR* — в 122 (см. табл. 1). С применением непараметрического критерия Манна–Уитни показано статистически высоко значимое ($p < 0.001$) повышение уровня метилирования всех пяти исследованных генов днРНК в опухолях. На рис. 1 представлены результаты сравнения уровней метилирования пяти генов днРНК.

С целью оценки связи гиперметилирования пяти генов с прогрессией РЯ сравнили уровни метилирования на III–IV и на I–II стадиях и установили статистически значимое ($p \leq 0.001$) повышение уровня метилирования генов *SNHG6* и *SNHG12* на более поздних клинических стадиях РЯ (рис. 2а). Установлено также статистически значимое ($p \leq 0.001$) повышение уровня метилирования генов *SNHG6* и *TINCR* с увеличением степени злокачественности (снижение дифференцировки) РЯ (рис. 2б).

Далее исследовали связь между уровнями метилирования генов днРНК и наличием метастазов (рис. 3).

Если учитывать метастазы всех типов, включая отдаленные гематогенные, лимфогенные и перитонеальные (сравнивали 79 образцов РЯ с метастазами и 43 образца без метастазов), то выявили значимые различия в метилировании генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* (рис. 3а). Показана также связь метилирования генов *SNHG6* и *SNHG12* с метастазированием в региональные лимфатические узлы (рис. 3б). Кроме того, обнаружено снижение уровня метилирования гена *SNHG12* в 29 перитонеальных метастазах относительно парных первичных опухолей (рис. 3в).

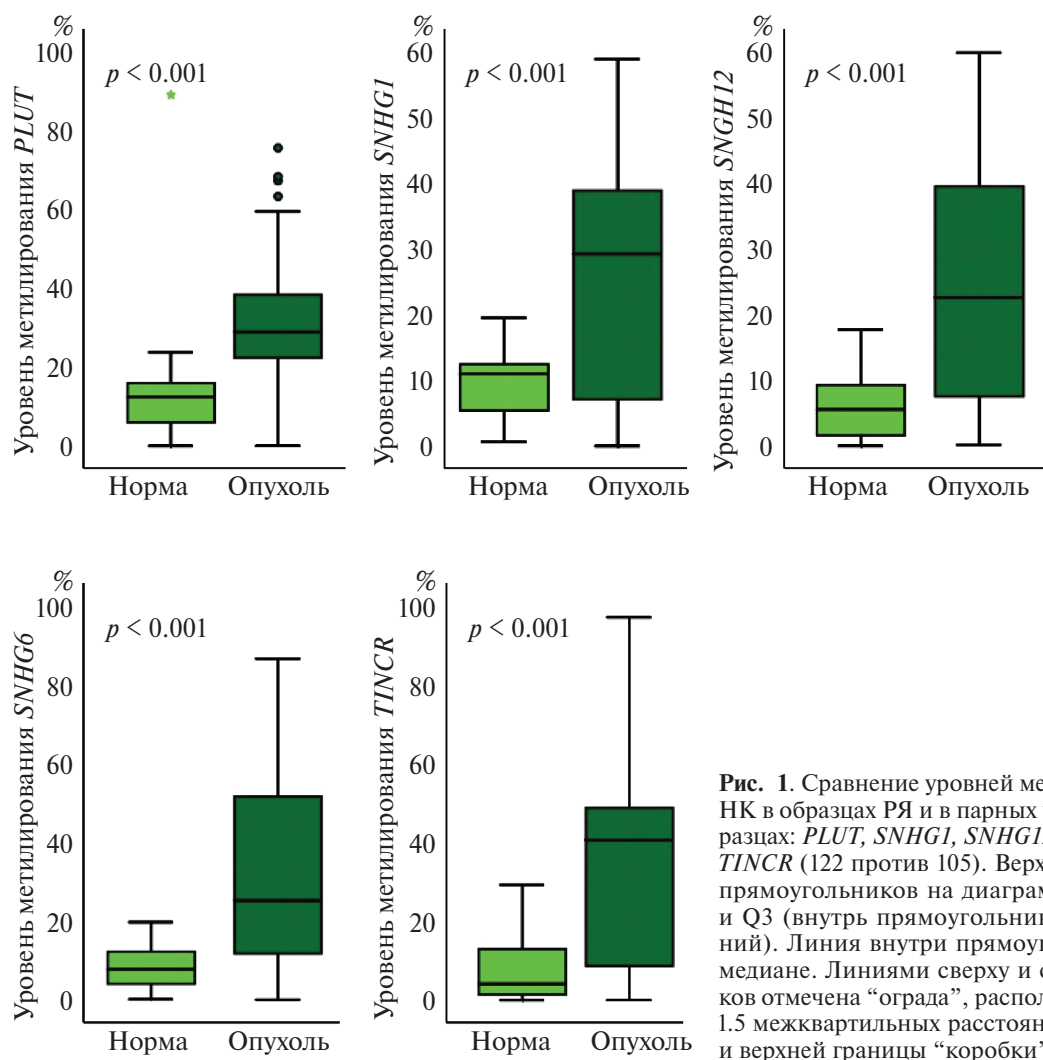


Рис. 1. Сравнение уровней метилирования генов днРНК в образцах РЯ и в парных условно нормальных образцах: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG12* (93 против 75), *SNHG6*, *TINCR* (122 против 105). Верхняя и нижняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют Q1 и Q3 (внутри прямоугольника попадает 50% значений). Линия внутри прямоугольника соответствует медиане. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечена "ограда", расположенная на расстоянии 1.5 межквартильных расстояний (Q1–Q3) от нижней и верхней границы "коробки".

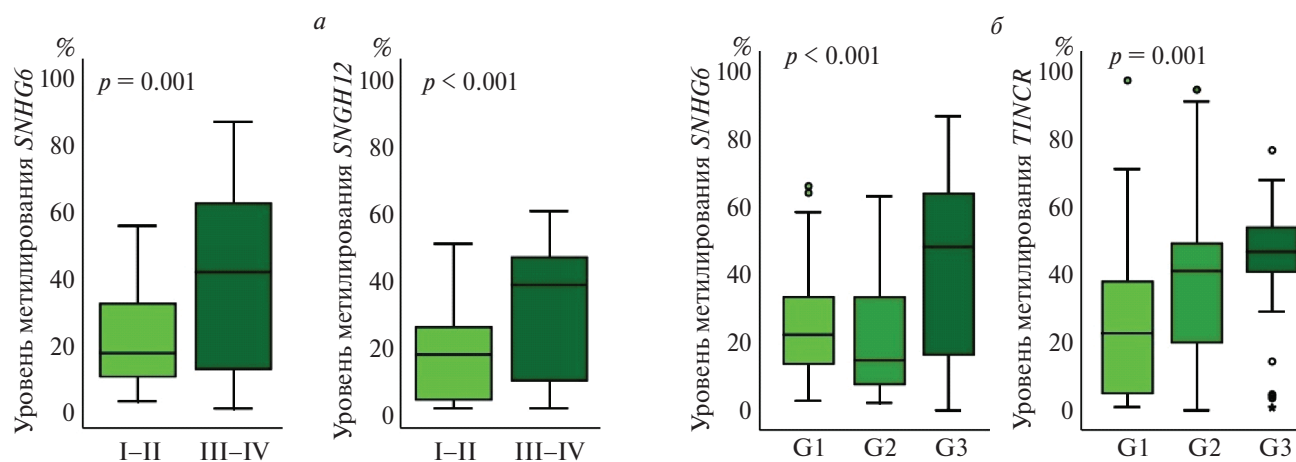


Рис. 2. Повышение уровня метилирования генов днРНК *SNHG6* и *SNHG12* на поздних стадиях РЯ (III, IV, 77 образцов) по сравнению с ранними стадиями РЯ (I–II, 45 образцов) (а); и генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* по мере увеличения степени злокачественности (G1–G2–G3) (б); для сравнения трех групп применен непараметрический критерий Краскала–Уоллиса.

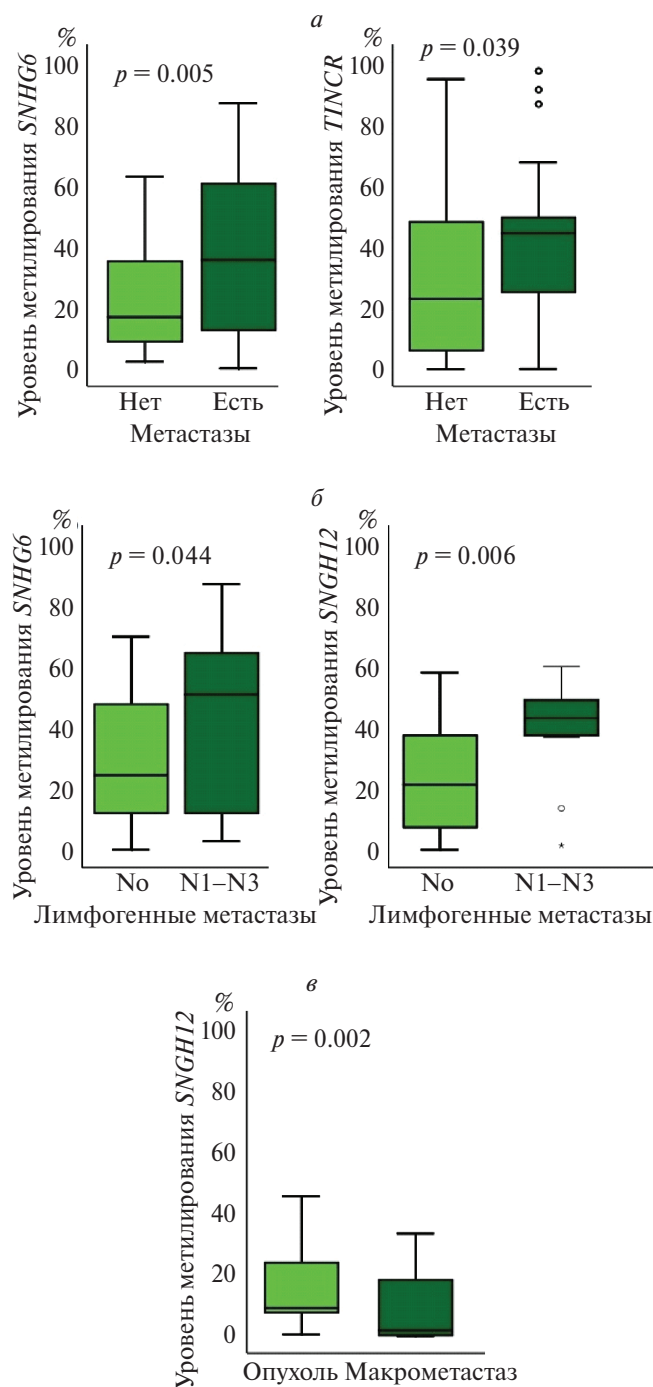


Рис. 3. Связь между повышением уровней метилирования генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* в образцах первичного РЯ с наличием метастазов всех типов, включая отдаленные гематогенные, лимфогенные и перитонеальные (а), и генов *SNHG6* и *SNHG12* с наличием лимфогенных метастазов (б). Снижение уровня метилирования *SNHG12* в макроскопических перитонеальных метастазах относительно парных первичных опухолей (в). Применен непараметрический критерий Манна–Уитни.

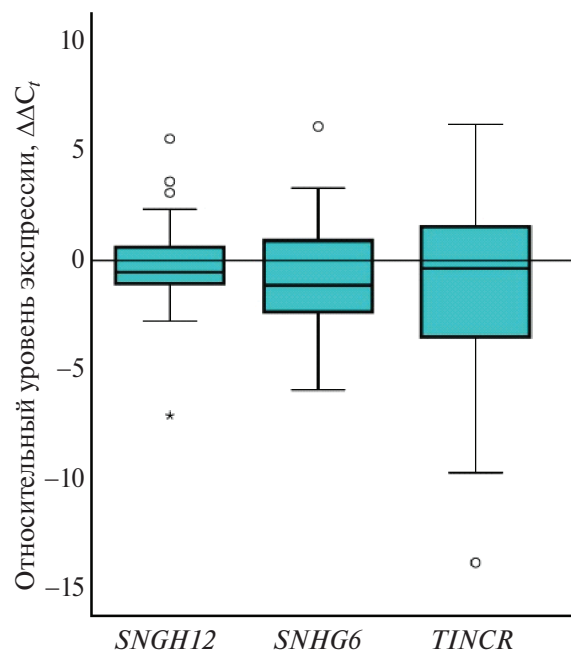


Рис. 4. Анализ уровней экспрессии генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* (30 парных образцов РЯ) и *TINCR* (69 парных образцов РЯ) методом количественной ПЦР.

Итак, три из пяти исследованных генов днРНК — *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* — связаны с прогрессией РЯ, включая клиническую стадию и степень злокачественности, а также метастазирование. Далее изучена возможная связь гиперметилирования этих трех генов днРНК с изменением уровня их экспрессии. Изменения уровня экспрессии генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* представлены на рис. 4.

Установлено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *TINCR* ($p = 0.02$), marginally значимое — гена *SNHG6* ($p = 0.08$) и на уровне тенденции — гена *SNHG12* (9/30, 30% против 5/30, 17%).

С использованием коэффициента корреляции Спирмена (r_s) сопоставлены изменения уровней метилирования и экспрессии генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* в общих выборках образцов РЯ. Выявлена значимая отрицательная корреляция этих параметров генов *SNHG6* ($r_s = -0.66$, $p < 0.001$) и *TINCR* ($r_s = -0.49$, $p < 0.001$) (рис. 5).

Таким образом, ассоциация метилирования со снижением экспрессии наиболее убедительно показана для генов *SNHG6* и *TINCR*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные нами при изучении aberrantного метилирования пяти генов днРНК (*PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*), позволяют предполагать участие гиперметилирования этих

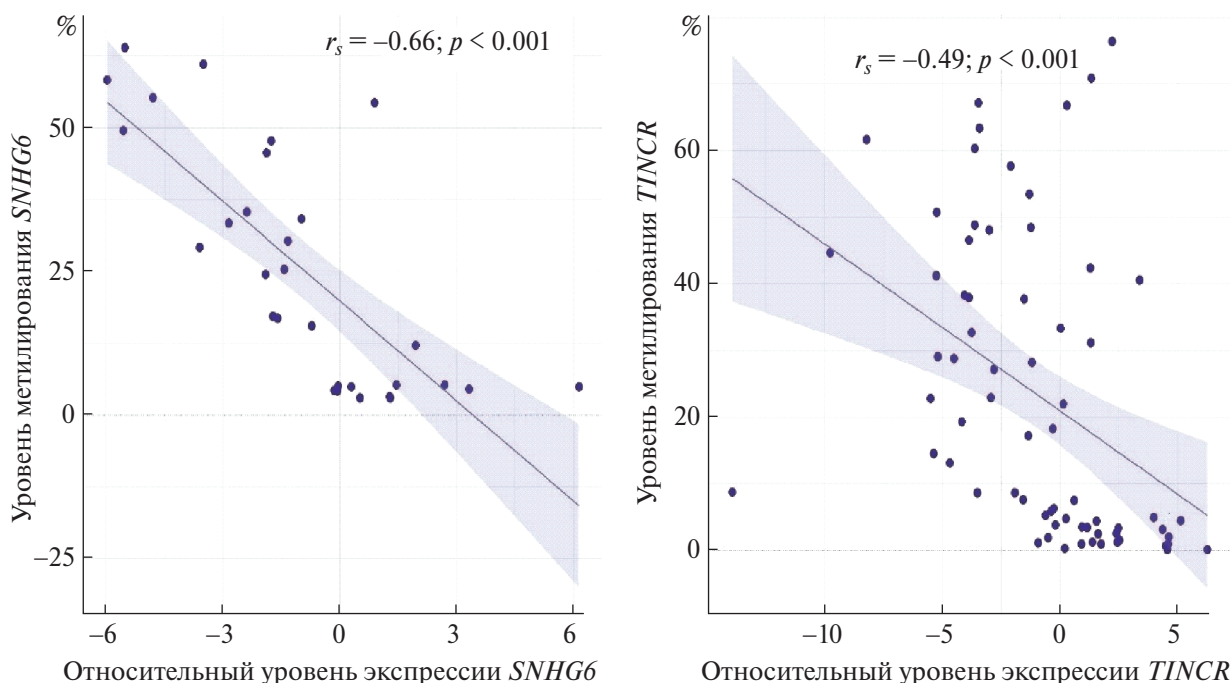


Рис. 5. Статистически значимая отрицательная корреляция между изменениями уровней метилирования и экспрессии генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* в общих выборках образцов (30 и 69 соответственно) РЯ. Применен коэффициент корреляции Спирмена (r_s).

генов в возникновении и развитии РЯ. Следует подчеркнуть практически полное отсутствие публикаций, посвященных роли метилирования этих генов в патогенезе РЯ. Показана вовлеченность *SNHG12* в эпигенетические механизмы и развитие устойчивости РЯ к химиотерапии [13], а также представлены результаты предварительного изучения гиперметилирования ряда генов днРНК, включая *TINCR*, проведенного нами на выборке из 40 образцов РЯ [14].

ДнРНК *PLUT/PDX1-AS1* (*PDX1* associated lncRNA, upregulator of transcription, *PLUTO*) регулирует экспрессию гена транскрипционного фактора *PDX1* (pancreatic and duodenal homeobox 1), участвующего в регуляции функций и идентичности β -клеток поджелудочной железы [21, 22]. Аномальное метилирование CpG-островков промоторного участка гена *PLUT* обнаружено в опухолях аденокарциномы легкого [23]. Гиперметилирование гена *PLUT* в РЯ указывает на возможную роль aberrантного метилирования в механизмах возникновения и развития РЯ. Отсутствие, по нашим данным, связи метилирования гена *PLUT* с прогрессией РЯ позволяет предполагать вовлеченность этой эпигенетической модификации только на начальных этапах патогенеза РЯ.

SNHG1 (Small Nucleolar RNA Host Gene 1), *SNHG6* (Small Nucleolar RNA Host Gene 6) и *SNHG12* (Small Nucleolar RNA Host Gene 12) входят в семейство днРНК, образовавшихся из генов малых ядрышковых РНК [24]. В отличие от

малых ядрышковых РНК, происходящих из интронов, днРНК семейства *SNHG* содержат последовательности как интронов, так и экзонов.

Для днРНК *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG12* в РЯ характерны скорее проонкогенные, чем супрессорные функции [25–28]. Так, на клеточных линиях РЯ показано, что *SNHG6* участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе, активируя ассоциированный с этим переходом белок YAP1 (Yes-associated protein 1) [27]. Причем сообщается также о повышенной экспрессии *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG12* в образцах РЯ [25–28]. Однако это противоречит данным ресурса GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), согласно которым экспрессия этих днРНК снижена в опухолях яичников: *SNHG1* и *SNHG12* ($p < 0.01$), *SNHG6* ($p < 0.1$).

Данные о снижении уровня экспрессии генов *SNHG6* и *SNHG12* и о статистически значимой корреляции между уровнями метилирования и экспрессии гена днРНК *SNHG6* убедительно указывают на возможное участие метилирования в подавлении транскрипции данных генов и позволяют предположить, что днРНК *SNHG6* и *SNHG12* могут обладать супрессорной активностью при РЯ.

Полученные нами данные об ассоциации гиперметилирования генов днРНК *SNHG6* и *SNHG12* с более поздней клинической стадией и метастазированием РЯ указывают на вовлеченность этих днРНК и модификаций их генов в прогрессию РЯ. Анализ макроскопических перитонеальных

метастазов выявил интересную особенность гена *SNHG12*. Оказалось, что если по мере прогрессии опухоли уровень метилирования этого гена повышается, то в самих перитонеальных метастазах уровень метилирования гена *SNHG12*, наоборот, снижается. Противоположную направленность изменений уровня метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1* и микроРНК *miR-148a* в перитонеальных метастазах РЯ и в парных опухолях мы отмечали и ранее [14, 20]. Это может указывать на участие эпигенетических факторов в реверсии эпителиально-мезенхимального перехода в мезенхимально-эпителиальный, наблюдаемый в макроскопических метастазах [29, 30].

ДнРНК *TINCR* ((terminal/tissue) differentiation-induced non-coding RNA) участвует в контроле дифференцировки соматических клеток, в частности в контроле эпидермальной дифференцировки клеток человека и дифференцировки клеток бронхиального эпителия [31, 32]. Анализ интерактома РНК в масштабе генома показал, что *TINCR* взаимодействует с множеством мРНК, связанных с дифференцировкой посредством мотива “*TINCR*-бокс” из 25 нуклеотидов [30]. *TINCR* влияет на экспрессию важнейших регуляторов дифференцировки, таких как *SOX2*, *JAG1* и *HES1*, частично за счет связывания с белком *STAU1* [32]. Показано участие и других РНК-связывающих белков, таких как *IGF2BP3* (insulin-like growth factor 2 RNA-binding protein 3), в качестве посредников в регуляторных функциях *TINCR* [33].

Отмечено, что *TINCR* может действовать и как супрессор, и как онкоген в патогенезе опухолей разных нозологических форм [34]. Так, уровень экспрессии *TINCR* повышается при раке желудка, пищевода, мочевого пузыря и молочной железы, но он снижается при глиоме, ретинобластоме и раке простаты [34]. *TINCR* снижается также в образцах плоскоклеточного рака легкого, что согласуется со снижением дифференцировки, наблюдаемым при этом виде рака [31].

Согласно GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) и по нашим данным ($p = 0.02$), уровень транскрипции *TINCR* в РЯ снижен, поэтому можно предположить, что при РЯ днРНК *TINCR* действует как супрессор. В данной работе установлена также значимая обратная корреляция между уровнями метилирования и экспрессией ($r_s = -0.5$, $p < 0.001$), подтверждающая функциональную значимость метилирования гена *TINCR*.

Нами обнаружено повышение уровня метилирования гена *TINCR* при метастазировании ($p = 0.04$) и при снижении степени дифференцировки (G1-G2-G3, $p < 0.001$) клеток РЯ, что согласуется с данными о роли этой днРНК в контроле клеточной дифференцировки [31, 32].

Интересно, что *TINCR* – это РНК, выполняющая две функции: днРНК и мРНК, поскольку

в *TINCR* недавно обнаружена открытая рамка считывания, кодирующая убиквитинподобный микропротеин [35, 36], играющий супрессорную роль при плоскоклеточном раке легкого.

Необходимо подчеркнуть клиническое значение локусов, aberrантно метилируемых в опухолях и выявляемых как на основе белоккодирующих генов, так и на основе генов микроРНК и днРНК [37, 38]. Так, с помощью интегрированного эпигеномно-транскриптомного анализа в образцах рака легкого обнаружены восемь новых aberrантно метилированных драйверных генов и 13 aberrантно метилированных драйверных нкРНК, из которых пять микроРНК и восемь днРНК обладают диагностическим и терапевтическим потенциалом [38]. Возможности клинического применения генов днРНК широко исследуются. Показано, что гиперметилирование гена *PLUT*, обнаруживаемое в опухолях больных аденокарциномой легкого на ранних стадиях, может служить маркером риска ранних рецидивов [23]. Оказалось, что aberrантное метилирование гена *HOTAIR* можно использовать для прогнозирования устойчивости РЯ к химиотерапии карбоплатином [39]. Гиперметилирование промоторного района гена днРНК *LINC00473*, обнаруженное в ДНК плазмы больных колоректальным раком, предложено использовать для ранней неинвазивной диагностики этого вида рака [40]. Сравнение метилирования CpG-островков промоторных участков генов днРНК *H19* и *MALAT1* в периферической крови 150 больных раком желудка и 100 здоровых доноров показало, что уровень метилирования этих генов днРНК можно использовать для неинвазивной диагностики рака желудка [41].

Таким образом, нами получены данные, позволяющие предполагать вовлеченность гиперметилирования пяти генов днРНК *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* в развитие РЯ, а генов *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* – в прогрессию РЯ, включая клиническую стадию, степень злокачественности и метастазирование. Нами изучена ассоциация гиперметилирования трех генов днРНК, связанных с прогрессией РЯ, с подавлением их экспрессии, обнаружено снижение экспрессии этих генов в РЯ и обратная корреляция между уровнями метилирования и экспрессии *SNHG6* и *TINCR*. Представленные здесь данные указывают на супрессорную роль днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* в патогенезе РЯ, однако для проверки этих предположений необходимо проведение дальнейших исследований. Данные по гиперметилированию генов днРНК могут быть полезны при отборе новых биомаркеров или терапевтических мишеней при РЯ.

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

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. Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (протоколы заседаний № 4Б от 24.11.2020 и № 2 от 04.04.2023). От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Все обследованные — совершеннолетние.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249.
doi: 10.3322/caac.21660
2. (2022) Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 252 с.
3. Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P., Bartel D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. **455**(7209), 64–71.
doi: 10.1038/nature07242
4. Esteller M. (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**(12), 861–874.
doi: 10.1038/nrg3074
5. Буре И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. (2018) Длинные некодирующие РНК и их роль в онкогенезе. *Молекуляр. биология*. **52**(6), 907–920.
doi: 10.1134/S0026893318060031
6. Zhang X., Wang W., Zhu W., Dong J., Cheng Y., Yin Z., Shen F. (2019) Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(22), 5573.
doi: 10.3390/ijms20225573
7. Guttman M., Rinn J.L. (2012) Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*. **482**(7385), 339–346.
doi: 10.1038/nature10887
8. Murtha M., Esteller M. (2016) Extraordinary cancer epigenomics: thinking outside the classical coding and promoter box. *Trends Cancer*. **2**(10), 572–584.
doi: 10.1016/j.trecan.2016.08.004
9. Moutinho C., Esteller M. (2017) MicroRNAs and epigenetics. *Adv. Cancer Res.* **135**, 189–220.
doi: 10.1016/bs.acr.2017.06.003
10. Sheng X., Li J., Yang L., Chen Z., Zhao Q., Tan L., Zhou Y., Li J. (2014) Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **32**(1), 277–285.
doi: 10.3892/or.2014.3208
11. Diaz-Lagares A., Crujeiras A.B., Lopez-Serra P., Soler M., Setien F., Goyal A., Sandoval J., Hashimoto Y., Martinez-Cardús A., Gomez A., Heyn H., Moutinho C., Espada J., Vidal A., Paúles M., Galán M., Sala N., Akiyama Y., Martínez-Iniesta M., Farré L., Villanueva A., Gross M., Diederichs S., Guil S., Esteller M. (2016) Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**(47), E7535–E7544.
doi: 10.1073/pnas.1608585113
12. Gokulnath P., de Cristofaro T., Manipur I., Di Palma T., Soriano A.A., Guarracino M.R., Zannini M. (2020) Long non-coding RNA HAND2-AS1 acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(11), 4059.
doi: 10.3390/ijms21114059
13. Abildgaard C., do Canto L.M., Rainho C.A., Marchi F.A., Calanca N., Waldstrøm M., Steffensen K.D., Rogatto S.R. (2022) The long non-coding RNA SNHG12 as a mediator of carboplatin resistance in ovarian cancer via epigenetic mechanisms. *Cancers* (Basel). **14**(7), 1664.
doi: 10.3390/cancers14071664
14. Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Иванова Н.А., Лукина С.С., Пронина И.В., Логинов В.И., Фридман М.В., Казубская Т.П., Уткин Д.О., Брага Э.А., Кушлинский Н.Е. (2021) Гиперметилование генов новых длинных некодирующих РНК в опухолях яичников и метастазах: двойственный эффект. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **171**(3), 370–374.
doi: 10.1007/s10517-021-05230-3
15. World Medical Association (2013) World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. **310**(20), 2191–2194.
doi: 10.1001/jama.2013.281053
16. (2017) *The TNM Classification of Malignant Tumours, 8th ed.* Eds Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Oxford: Wiley-Blackwell.
17. (2014) *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 4th ed.* Eds Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. Lyon: IARC Press.
18. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyy A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. (2017) DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. **604**, 1–8.
doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018
19. van Hoesel A.Q., Sato Y., Elashoff D.A., Turner R.R., Giuliano A.E., Shamonki J.M., Kuppen P.J., van de Velde C.J., Hoon D.S. (2013) Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *Br. J. Cancer*. **108**, 2033–2038.
doi: 10.1038/bjc.2013.136
20. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdennyy A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Uroshlev L.A., Fridman M.V., Brovkina O.I., Apanovich N.V., Karpukhin A.V., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. (2022) 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.* **23**(3), 1300.
doi: 10.3390/ijms23031300
21. Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K., Edlund H. (1998) Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl1*/

- Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* **12**(12), 1763–1768. doi: 10.1101/gad.12.12.1763
22. Ebrahim N., Shakirova K., Dashinimaev E. (2022) PDX1 is the cornerstone of pancreatic β -cell functions and identity. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 1091757. doi: 10.3389/fmolb.2022.1091757
 23. Kim-Wanner S.Z., Assenov Y., Nair M.B., Weichenhan D., Benner A., Becker N., Landwehr K., Kuner R., Sultmann H., Esteller M., Koch I., Lindner M., Meister M., Thomas M., Bieg M., Klingmüller U., Schlesner M., Warth A., Brors B., Seifried E., Bönig H., Plass C., Risch A., Muley T. (2020) Genome-wide DNA methylation profiling in early stage I lung adenocarcinoma reveals predictive aberrant methylation in the promoter region of the long non-coding RNA *PLUT*: an exploratory study. *J. Thorac. Oncol.* **15**(8), 1338–1350. doi: 10.1016/j.jtho.2020.03.023
 24. Zimta A.A., Tigu A.B., Braicu C., Stefan C., Ionescu C., Berindan-Neagoe I. (2020) An emerging class of long non-coding RNA with oncogenic role arises from the snoRNA host genes. *Front. Oncol.* **10**, 389. doi: 10.3389/fonc.2020.00389
 25. Wang S., Jiang J., Wang Z., Xie Y., Wu X. (2017) Long non-coding RNA SNHG1 is an unfavorable prognostic factor and promotes cell proliferation and migration by Wnt/ β -catenin pathway in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **10**(9), 9284–9292.
 26. Wu Y., Zhu B., Yan Y., Bai S., Kang H., Zhang J., Ma W., Gao Y., Hui B., Li R., Zhang X., Ren J. (2021) Long non-coding RNA SNHG1 stimulates ovarian cancer progression by modulating expression of miR-454 and ZEB1. *Mol. Oncol.* **15**(5), 1584–1596. doi: 10.1002/1878-0261.12932
 27. Su M., Huang P., Li Q. (2023) Long noncoding RNA SNHG6 promotes the malignant phenotypes of ovarian cancer cells via miR-543/YAP1 pathway. *Heliyon.* **9**(5), e16291. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16291
 28. Sun D., Fan X.H. (2019) LncRNA SNHG12 accelerates the progression of ovarian cancer via absorbing miRNA-129 to upregulate SOX4. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(6), 2345–2352. doi: 10.26355/eurev_201903_17378
 29. Tam W.L., Weinberg R.A. (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* **19**(11), 1438–1449. doi: 10.1038/nm.3336
 30. Харченко Е.П., Соловьев И.А. (2016) Метастазирование и ранковая спячка. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* **5**(5), 72–77. <https://doi.org/10.17116/onkolog20165572-77>
 31. Kretz M., Siprashvili Z., Chu C., Webster D.E., Zehnder A., Qu K., Lee C.S., Flockhart R.J., Groff A.F., Chow J., Johnston D., Kim G.E., Spitale R.C., Flynn R.A., Zheng G.X., Aiyer S., Raj A., Rinn J.L., Chang H.Y., Khavari P.A. (2013) Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature.* **493**(7431), 231–235. doi: 10.1038/nature11661
 32. Omote N., Sakamoto K., Li Q., Schupp J.C., Adams T., Ahangari F., Chioccioli M., Deluliis G., Hashimoto N., Hasegawa Y., Kaminski N. (2021) Long noncoding RNA TINCR is a novel regulator of human bronchial epithelial cell differentiation state. *Physiol. Rep.* **9**(3), e14727. doi: 10.14814/phy2.14727
 33. Zheng Z.Q., Li Z.X., Guan J.L., Liu X., Li J.Y., Chen Y., Lin L., Kou J., Lv J.W., Zhang L.L., Zhou G.Q., Liu R.Q., Chen F., He X.J., Li Y.Q., Li F., Xu S.S., Ma J., Liu N., Sun Y. (2020) Long noncoding RNA TINCR-mediated regulation of acetyl-CoA metabolism promotes nasopharyngeal carcinoma progression and chemoresistance. *Cancer Res.* **80**(23), 5174–5188. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3626
 34. Ghafouri-Fard S., Dashti S., Taheri M., Omrani M.D. (2020) TINCR: an lncRNA with dual functions in the carcinogenesis process. *Noncoding RNA Res.* **5**(3), 109–115. doi: 10.1016/j.ncrna.2020.06.003
 35. Eckhart L., Lachner J., Tschachler E., Rice R.H. (2020) TINCR is not a non-coding RNA but encodes a protein component of cornified epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **29**(4), 376–379. doi: 10.1111/exd.14083
 36. Morgado-Palacin L., Brown J.A., Martinez T.F., Garcia-Pedrero J.M., Forouhar F., Quinn S.A., Reglero C., Vaughan J., Heydari Y.H., Donaldson C., Rodriguez-Perales S., Allonca E., Granda-Diaz R., Fernandez A.F., Fraga M.F., Kim A.L., Santos-Juanes J., Owens D.M., Rodrigo J.P., Saghatelian A., Ferrando A.A. (2023) The TINCR ubiquitin-like microprotein is a tumor suppressor in squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* **14**(1), 1328. doi: 10.1038/s41467-023-36713-8
 37. Sigin V.O., Kalinkin A.I., Nikolaeva A.F., Ignatova E.O., Kuznetsova E.B., Chesnokova G.G., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Vinogradov I.I., Vinogradov M.I., Vinogradov I.Y., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V., Kutsev S.I., Tanas A.S., Strelnikov V.V. (2023) DNA methylation and prospects for predicting the therapeutic effect of neoadjuvant chemotherapy for triple-negative and luminal B breast cancer. *Cancers (Basel).* **15**(5), 1630. doi: 10.3390/cancers15051630
 38. Sun X., Yi J., Yang J., Han Y., Qian X., Liu Y., Li J., Lu B., Zhang J., Pan X., Liu Y., Liang M., Chen E., Liu P., Lu Y. (2021) An integrated epigenomic-transcriptomic landscape of lung cancer reveals novel methylation driver genes of diagnostic and therapeutic relevance. *Theranostics.* **11**(11), 5346–5364. doi: 10.7150/thno.58385
 39. Teschendorff A.E., Lee S.H., Jones A., Fiegl H., Kalwa M., Wagner W., Chindera K., Evans I., Dubeau L., Orjalo A., Horlings H.M., Niederreiter L., Kaser A., Yang W., Goode E.L., Fridley B.L., Jenner R.G., Berns E.M., Wik E., Salvesen H.B., Wisman G.B., van der Zee A.G., Davidson B., Trope C.G., Lambrechts S., Vergote I., Calvert H., Jacobs I.J., Widschwendter M. (2015) HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer. *Genome Med.* **7**, 108. doi: 10.1186/s13073-015-0233-4
 40. Ruiz-Bañobre J., Rodriguez-Casanova A., Costa-Fraga N., Bao-Caamano A., Alvarez-Castro A., Carreras-Presas M., Brozos-Vazquez E., Vidal-Insua Y., Vazquez-Rivera F., Candamio-Folgar S., Mosquera-Presedo M., Lago-Lestón R.M., Muñelo-Romay L., Vázquez-Bueno J.Á., Sanz-Pamplona R., Moreno V., Goel A., Castillo L., Martín A.C., Arroyo R., Esteller M., Crujeiras A.B., López-López R., Díaz-Lagares A. (2022) Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the

- LINC00473 promoter in plasma cell-free DNA. *Clin. Epigenetics*. **14**(1), 86.
doi: 10.1186/s13148-022-01302-x
41. Hu D., Lou X., Meng N., Li Z., Teng Y., Zou Y., Wang F. (2021) Peripheral blood-based DNA methylation of long non-coding RNA H19 and metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 promoters are potential non-invasive biomarkers for gastric cancer detection. *Cancer Control*. **28**, 10732748211043667.
doi: 10.1177/10732748211043667

METHYLATION OF LONG NON-CODING RNA GENES: *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR* IN OVARIAN CANCER

S. S. Lukina¹, A. M. Burdennyi^{1, *}, E. A. Filippova¹, L. A. Uroshlev², I. V. Pronina¹,
N. A. Ivanova¹, M. V. Fridman², K. I. Zhordania³, 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*N.N. 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

Ovarian cancer (OC) develops asymptotically and is not diagnosed until advanced stages, which increases the mortality rate from this disease. In the diagnosis and treatment of OC, new prospects have been opened in studies of the gene regulation mechanisms involving long non-coding RNAs (lncRNAs) and identification of lncRNA genes inhibited by methylation of promoter regions. Using a set of 122 samples of primary OC tumors, by methylation specific real-time PCR, changes in the methylation level of a group of lncRNA genes were studied: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, and *TINCR*. Using the nonparametric Mann–Whitney test, a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the methylation level of these 5 lncRNA genes in tumors was shown. A statistically significant ($p < 0.05$) correlation was established between the level of methylation of the lncRNA genes *SNHG6*, *SNHG12* and *TINCR* with the stage of the tumor process, the histological grade and the presence of metastases. Using real-time RT-qPCR, a decrease in the expression level of the *SNHG6*, *SNHG12* and *TINCR* genes was observed and a significant correlation of methylation with the expression of *SNHG6* and *TINCR* was shown ($r_s \leq -0.5$, $p < 0.001$). Thus, new lncRNA genes representing potential epigenetic markers of ovarian cancer have been identified.

Keywords: methylation of promoter regions, long non-coding RNA genes, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, ovarian cancer