

Изменение паттерна метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Е.Н. Воропаева^{1,2}, Т.И. Поспелова², А.М. Нестерев¹, М.И. Чуркина², О.В. Березина², В.Н. Максимов^{1,2}

¹ НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Резюме

Изучение статуса метилирования ДНК при злокачественных лимфомах представляет собой новую область исследований в онкогематологии. Целью настоящего исследования послужила количественная оценка уровня метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). **Материал и методы.** В исследование включены 81 опухолевый образец ДВККЛ (26 герминального и 55 негерминального происхождения) и 11 биоптатов реактивных лимфоузлов. Для количественной оценки метилирования гена *MIR-143* использовался метод прямого бисульфитного секвенирования по Сенгеру с расчетом среднего уровня метилирования анализируемых CpG-сайтов. **Результаты.** Средний уровень метилирования *MIR-143* в опухолевых образцах был существенно ниже значений в реактивных лимфоузлах (соответственно $64,43 \pm 19,92$ и $76,27 \pm 4,92$ %, $p = 0,049$), не зависел от иммуногистохимического подтипа опухоли и демонстрировал больший разброс значений. В образцах лимфомы имело место преимущественное гипометилирование одного из четырех анализируемых CpG-динуклеотидов в границах анализируемого фрагмента. **Заключение.** Получены данные об изменении паттерна метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани ДВККЛ. Требуются дальнейшие исследования, направленные на уточнения механизмов эпигенетической регуляции экспрессии *MIR-143* в лимфомных клетках, и идентификация ее м-РНК мишеней для прояснения роли данной микроРНК в патогенезе ДВККЛ.

Ключевые слова: метилирование, микроРНК, *MIR-143*, злокачественные лимфомы, экспрессия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 22-25-00222.

Автор для переписки: Воропаева Е.Н., e-mail: vena.81@mail.ru

Для цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Нестерев А.М., Чуркина М.И., Березина О.В., Максимов В.Н. Изменение паттерна метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(5):169–176. doi: 10.18699/SSMJ20230519

Changes in the *MIR-143* gene methylation pattern in the tumor tissue of the diffuse large B-cell lymphoma

E.N. Voropaeva^{1,2}, T.I. Pospelova², A.M. Nesterets¹, M.I. Churkina², O.V. Berezina², V.N. Maksimov^{1,2}

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS
630089, Novosibirsk, Borisa Bogatkova st., 175/1

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

Abstract

The study of DNA methylation status in malignant lymphomas is a new field of research in oncohematology. The aim of this study was to quantify the level of methylation of the *MIR-143* gene in the tumor tissue of patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Material and methods.** The study included 81 tumor samples of DLBCL (26 of germinal and 55 of non-germinal origin) and 11 biopsies of reactive lymph nodes. To quantify the methylation of the *MIR-143* gene, the method of direct bisulfite sequencing by Sanger was used with the calculation of the average level of methylation of the analyzed CpG-sites. **Results.** The average level of *MIR-143* methylation in tumor samples was significantly lower than the values in reactive lymph nodes (64.43 ± 19.92 и 76.27 ± 4.92 %, respectively, $p = 0.049$), did not depend on the immunohistochemical subtype of the tumor and showed a greater spread of values. In the lymphoma samples, there was predominant hypomethylation of one of the four analyzed CpG-dinucleotides within the boundaries of the analyzed fragment. **Conclusion.** The data on a change in the pattern of the *MIR-143* gene methylation in the tumor tissue of DLBCL were obtained. To establish the role of microRNA in the pathogenesis of DLBCL further studies aimed at clarifying the mechanisms of epigenetic regulation of *MIR-143* expression in lymphoma cells and identification of this microRNA targets are required.

Key words: methylation, microRNA, *MIR-143*, malignant lymphomas, expression.

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

Financing: This work was supported by Russian scientific fund, grant № 22-25-00222.

Correspondence author: Voropaeva E.N., e-mail: vena.81@mail.ru

Citation: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Nesterets A.M., Churkina M.I., Berezina O.V., Maksimov V.N. Changes in the *MIR-143* gene methylation pattern in the tumor tissue of the diffuse large B-cell lymphoma. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(5):169–176. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230519

Введение

Исследования метилирования ДНК вносят важный вклад в понимание роли эпигенетических факторов в возникновении различных патологий человека. Установлено, что паттерн метилирования ДНК в норме и при опухолевых заболеваниях существенно различается, а именно: на этапах становления злокачественного новообразования и опухолевой прогрессии происходит гипометилирование про-онкогенов и многочисленных областей ДНК-повторов наряду с гиперметилированием генов онкосупрессоров. При этом метилирование является стабильной эпигенетической модификацией ДНК и в большинстве случаев затрагивает CpG-островки, находящиеся в промоторной области и в первом экзоне генов, что подавляет их транскрипцию вплоть до полного выключения [1].

Аберрантное метилирование генов микроРНК – одно из распространенных нарушений при опухолях различной тканевой принадлежности [2, 3]. Гены ряда онкосупрессорных микроРНК, например, семейства miR-34, подвергаются эпигенетическому выключению путем метилирования при подавляющем большинстве изученных злокачественных новообразований, тогда как другие – лишь при ряде онкологических нозологий или даже специфично метилированы при отдельных типах рака [4].

Исследования, направленные на изучение статуса метилирования ДНК при злокачественных лимфомах, представляют собой относи-

тельно новую область молекулярной биологии, медицинской генетики и онкологии. В ряде работ по анализу дифференциальной экспрессии микроРНК в опухолевой и здоровой лимфоидной ткани получены данные о нарушении экспрессии при лимфомах ряда p53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК. Предполагается, что такие различия могут быть связаны с аберрантным метилированием кодирующих их генов [5, 6]. Так, при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) описано снижение уровня микроРНК miR-143, являющейся прямой мишенью p53. Экспрессия ее регулируется белком p53 как напрямую на этапе транскрипции, так и дополнительно на посттранскрипционном уровне [7, 8]. Недостаточный уровень miR-143 нарушает реализацию p53-сигнального каскада, направленного на запуск программированной клеточной смерти, контроль пролиферации и инвазии, адгезии и миграции клеток [9]. Известно также, что кодирующий ее ген *MIR-143* имеет CpG-островок, а аберрантное метилирование гена имеет значение в лейкозогенезе [10].

Целью настоящего исследования было провести количественную оценку уровня метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ.

Материал и методы

В исследование включены биоптаты 81 фиксированного формалином и парафинизированного опухолевого лимфоузла пациентов с ДВККЛ и

11 лимфоузлов больных с реактивной лимфаденопатией. Средний возраст пациентов составил $50,3 \pm 8,9$ и $46,7 \pm 13,6$ года соответственно. Согласно результатам иммуногистохимического исследования, к лимфоме из клеток герминального и негерминального происхождения были отнесены соответственно 26 и 55 опухолевых образцов.

Применялась модификация фенол-хлороформного метода экстракции ДНК с гуанидином. Для исследования с каждого образца брали по 5–6 срезов толщиной 6–7 мкм в отдельную пробирку объемом 1,5 мл. В первый день выделения пробу помещали в термостат на 68°C до растапливания парафина. Добавляли по 600 мкл 5М гуанидина, в состав которого на 100 мл входят 50,2 г гуанидина, 5 мл 5М NaCl, 5 мл 0,5М ЭДТА, 2,5 мл 20 % додецилсульфата натрия, и оставляли для прохождения лизиса на ночь в термостате при 65°C . На второй день выполнялась фенол-хлороформная экстракция с трехкратной обработкой фенол-хлороформом. Для этого к пробе добавляли по 600 мкл смеси фенола с хлороформом в соотношении 1:1 (хлороформ содержал изоамиловый спирт в соотношении 24:1), встряхивали, центрифугировали при 12000 оборотов 10 минут. После разделения фаз отбирали верхнюю фазу, далее следовала стадия осаждения ДНК спиртами по стандартной методике. Осадки растворяли в бидистиллированной воде (количество воды в зависимости от объема ДНК 30–50 мкл) и хранили до проведения ПЦР при температуре -20°C . Качество и чистоту полученной ДНК проверяли на аппарате Epoch (BioTek Instruments, США).

Далее каждый ДНК-образец подвергали конверсии бисульфитом натрия согласно протоколу производителя, в ходе которой добивались перехода всех неметилированных остатков цитозина в урацил, тогда как метилированные оставались в неизменном виде. Полноту конверсии контролировали с использованием EZ DNA Methylation Kit и Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (Zymo research, США). Для количественной оценки уровня метилирования использовали метод прямого бисульфитного секвенирования по Сенгеру путем капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно описанным ранее подходам [11, 12] и методике [10]. Точность примененного подхода несколько ниже, чем пиросеквенирования или секвенирования на основе клонирования, в то время как его экономическая доступность, скорость и простота превосходят упомянутые методы [11].

Результаты секвенирования оценивали с помощью программы Chromas. Анализировали четыре CpG-динуклеотида в пределах фрагмента

длиной 217 п.н., расположенного между -156 и $+59$ п.н. от сайта начала трансляции. Данный фрагмент CpG-островка гена *MIR-143* в проведенных ранее экспериментах имел вариации паттерна метилирования в опухолевых и здоровых клетках человека (рис. 1).

Поскольку метилирование может наблюдаться не во всех клетках, говорят о среднем уровне (проценте) метилирования определенного CpG-сайта. Для его оценки отбирали хроматограммы сиквенсов с высоким уровнем сигнала и минимальным фоновым шумом (рис. 2), затем на них определяли высоту пиков цитозина и тимина в каждом CpG-динуклеотиде.

Поскольку секвенирование проводилось с обратного праймера, для количественного выражения уровня метилирования использовалась формула:

$$\% \text{метC} = 100 \times \text{hG} / (\text{hG} + \text{hA}),$$

где %метC – уровень метилирования цитозина; hG – высота пика гуанина; hA – высота пика аденина. Одиночный пик G рассматривали как 100%-е метилирование, одиночный пик A – как отсутствие метилирования, а перекрывающиеся G и A – как частичное метилирование (0–100 %).

Нормальность распределения параметров проверяли с использованием теста Колмогорова –

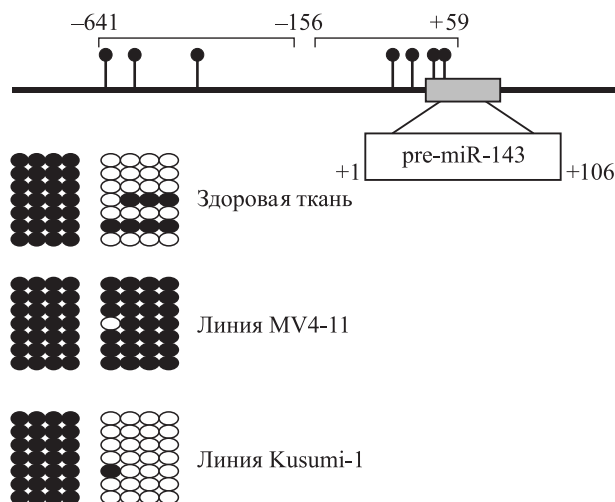


Рис. 1. Статус метилирования CpG-динуклеотидов в областях от -641 до -156 и от -156 до $+59$ нуклеотида относительно 5'-конца гена *MIR-143* в здоровой ткани (костный мозг) и опухолевых клетках линий острого лейкоза человека MV4-11 и Kusumi (по [3] с изменениями)

Fig. 1. The status of the CpG-dinucleotides methylation in the regions from -641 to -156 and from -156 to $+59$ nucleotides relative to the 5'-end of the *MIR-143* gene in healthy tissue (bone marrow) and tumor cells of human acute leukemia lines MV4-11 and Kusumi (according to [3] with changes)

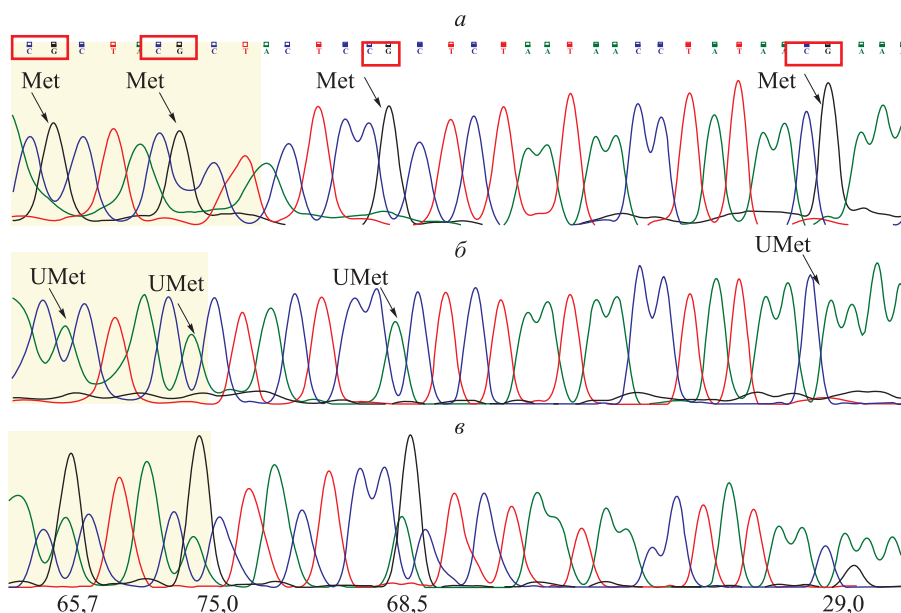


Рис. 2. Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса изучаемого CpG-островка гена MIR-143 (выполнен с использованием обратного праймера): рамкой выделены CpG-динуклеотиды, а – полностью метилированная ДНК, б – полностью неметилированная ДНК, в – опухолевый образец, где цифрами указан уровень метилирования каждого из анализируемых CpG-сайтов

Fig. 2. Fragment of the chromatogram of the bisulfite sequence of studied MIR-143 gene CpG-island (made using a reverse primer): CpG-dinucleotides are highlighted with a frame, а – full methylated DNA, б – full unmethylated DNA, в – tumor sample, where the numbers indicate the level of methylation of each of the analyzed CpG-sites

Смирнова. Для переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использованы значения медианы, 25-го и 75-го перцентиля (Me [Q25; Q75]). Расчеты проводились с использованием тестов Крускала – Уоллиса и Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Работа проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association) 2000 г. и Протоколом к Конвенции о правах человека и биомедицине (Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine) 1999 г. Исследование одобрено комитетом по этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. Все лица, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

Результаты

Уровень метилирования проанализированного фрагмента гена MIR-143 во всех образцах ДНК из реактивной ткани был схожим и составил $76,27 \pm 4,92$ %, тогда как опухолевые образцы демонстрировали больший разброс – $64,43 \pm 19,92$ %. При этом медианные значения уровня метилирования в опухолевых образцах были существенно

ниже значений в реактивных лимфоузлах (рис. 3, а). При оценке уровня метилирования в каждом из CpG-динуклеотидов (таблица) установлено, что описанные выше различия обусловлены одной из анализируемых позиций, а именно имело место значительное снижение уровня метилирования CpG1-динуклеотида в биоматериале, полученном из лимфотканной ткани; средний уровень метилирования в опухолевых образцах был статистически значимо меньше, чем в образцах больных с реактивной лимфаденопатией (рис. 3, б).

Разница в среднем уровне метилирования как всего анализируемого фрагмента гена MIR-143, так и CpG1-динуклеотида между реактивными и опухолевыми лимфоузлами сохранялась при разделении ДВККЛ на иммуногистохимические подтипы (рис. 3, в, г). При этом различия в уровне метилирования между изучаемыми иммуногистохимическими подтипами лимфомы не достигали статистической значимости (см. таблицу).

Обсуждение

Неуклонно растет число генов, в отношении которых показано изменение экспрессии при опухолях в результате изменения паттернов метилирования ДНК. Степень снижения или усиления метилирования широко варьирует как в зависимости от типа новообразования, так и при

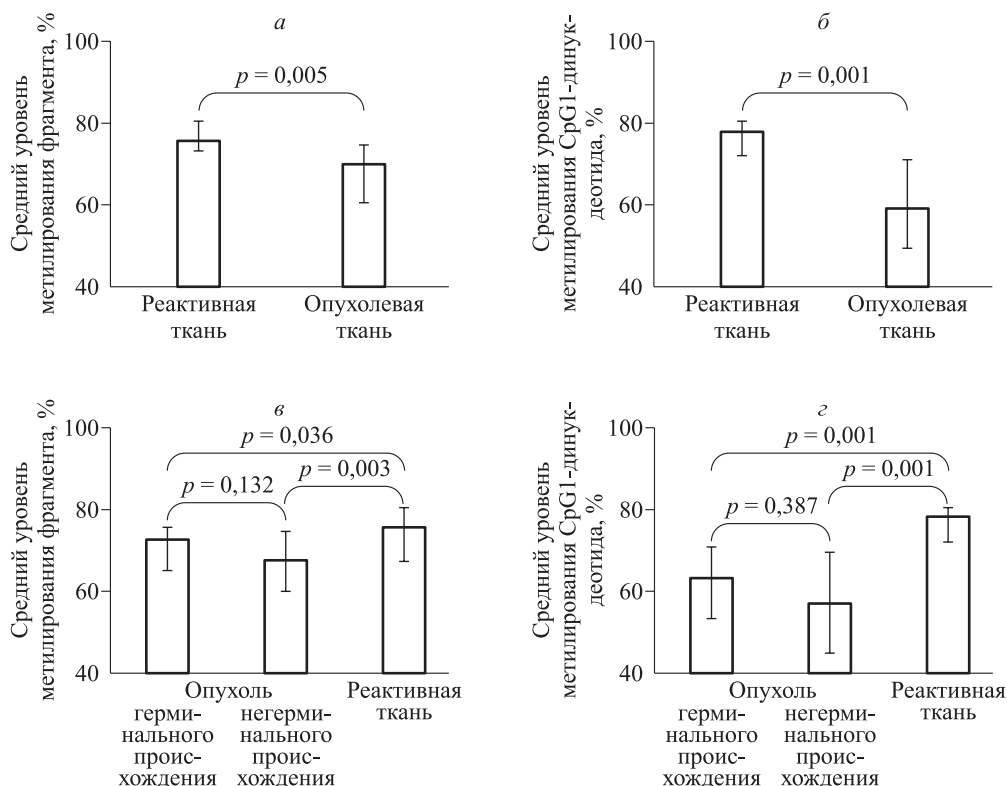


Рис. 3. Средний уровень метилирования ДНК в изученных образцах ($Me [Q25; Q75]$): всего анализируемого фрагмента в реактивных и опухолевых лимфоузлах (а) и в зависимости от иммуногистохимического подтипа лимфомы (в), а также уровень метилирования CpG1-динуклеотида в реактивных и опухолевых лимфоузлах (б) и в зависимости от иммуногистохимического подтипа лимфомы (г)

Fig. 3. The average level of DNA methylation in the studied samples ($Me [Q25; Q75]$): level of DNA methylation of analyzed fragment in reactive and tumor lymph nodes (a) and depending on the immunohistochemical lymphoma subtype (в), as well as level of DNA methylation of CpG1-dinucleotide in reactive and tumor lymph nodes (б) and depending on the immunohistochemical lymphoma subtype (г)

одном типе опухоли [1]. В данной работе методом прямого бисульфитного секвенирования по Сенгеру проведена количественная оценка уровня метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани 81 пациента с ДВККЛ и 11 образцах реактивных лимфоузлов. Данный метод позволяет осуществлять одновременный анализ всех CpG-сайтов, находящихся в пределах анализируемого фрагмента [13]. В первую очередь следует отметить значительную гетерогенность в опухолевых образцах доли метилированного аллеля в анализируемых CpG-динуклеотидах, чего не наблюдалось в биоматериале реактивной ткани. Также вопреки ожиданиям полученные результаты свидетельствовали о значимо более низком в сравнении с реактивными лимфоузлами среднем уровне метилирования изученного фрагмента последовательности гена *MIR-143* при ДВККЛ вне зависимости от иммуногистохимического подтипа.

В этой связи следует упомянуть работу С.Н. Lawrie et al. по анализу экспрессии miR-143

в биоматериале 98 больных ДВККЛ с помощью микрочипов. Авторы показали, что в опухолевой ткани она была выше в 14,22 раза, чем в здоровых В-клетках. При этом данная микроРНК не относилась к числу дифференциально экспрессируемых при разделении лимфомы на иммуногистохимические подтипы из клеток герминального и негерминального происхождения [14], что полностью созвучно с полученными нами результатами по количественной оценке уровня метилирования промоторного региона гена *MIR-143* при ДВККЛ. В литературе нами было найдено несколько возможных объяснений полученных результатов.

С одной стороны, различия в процентном содержании метилированного аллеля анализируемых CpG-сайтов могут не быть связанными непосредственно с опухолевыми клетками, а объясняться особенностями клеточного состава изученного биоматериала. Так, микроРНК miR-143 экспрессируется в большей степени в клетках мезенхимального происхождения, чем в лимфоидных элементах, поэтому более высокая

Уровень метилирования гена *MIR-143* в лимфоузлах пациентов с реактивной лимфаденопатией и в опухолевых лимфоузлах больных ДВККЛ, Ме [Q25; Q75]

The level of methylation *MIR-143* gene in the lymph nodes of patients with reactive lymphadenopathy and in the tumor lymph nodes of patients with DLBCL, Me [Q25; Q75]

Позиция	Уровень метилирования цитозина, %				<i>p</i>
	Реактивные лимфоузлы <i>n</i> = 11 (1)	Опухолевые лимфоузлы <i>n</i> = 81 (2)	Лимфома герминального происхождения <i>n</i> = 26 (3)	Лимфома негерминального происхождения <i>n</i> = 55 (4)	
Весь фрагмент	75,50 (71,80; 81,00)	70,00 (60,25; 74,75)	72,62 (64,50; 75,69)	67,00 (59,50; 74,75)	$p_{1-2} = 0,005$ $p_{1-3} = 0,036$ $p_{1-4} = 0,003$ $p_{3-4} = 0,132$
СрG1	78,00 (71,00; 81,00)	59,00 (47,50; 71,00)	63,00 (52,25; 72,00)	57,00 (44,00; 70,00)	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} = 0,001$ $p_{1-4} = 0,001$ $p_{3-4} = 0,387$
СрG2	85,00 (80,00; 89,00)	82,00 (68,00; 89,00)	83,50 (71,50; 89,00)	78,00 (65,00; 89,00)	$p_{1-2} = 0,219$ $p_{1-3} = 0,421$ $p_{1-4} = 0,185$ $p_{3-4} = 0,404$
СрG3	77,00 (70,00; 77,00)	73,00 (61,25; 82,00)	75,50 (69,25; 84,75)	71,00 (58,00; 81,25)	$p_{1-2} = 0,292$ $p_{1-3} = 0,909$ $p_{1-4} = 0,149$ $p_{3-4} = 0,135$
СрG4	67,00 (58,00; 79,00)	61,00 (50,00; 74,75)	67,00 (54,75; 74,50)	58,00 (48,00; 72,00)	$p_{1-2} = 0,113$ $p_{1-3} = 0,501$ $p_{1-4} = 0,056$ $p_{3-4} = 0,141$

плотность микрососудов как результат активации неоангиогенеза при опухолях может объяснять более низкий уровень метилирования гена *MIR-143* при ДВККЛ в сравнении с реактивной лимфаденопатией [15]. Однако утверждать это с полной уверенностью нельзя, поскольку в последние годы обнаружено, что подавляющее большинство изменений метилирования ДНК, специфичных для клеточного типа, происходит в дистальных регуляторных элементах, а именно в межгенных энхансерах. Именно изменения паттернов метилирования ДНК в данных областях, а не промоторах генов способствуют уникальной экспрессии генов среди различных типов тканей и клеток [16].

С другой стороны, более низкий уровень метилирования *MIR-143* в опухолевой ткани ДВККЛ может быть связан с глобальным гипометилированием генома клеток лимфомы, которое является ранним событием в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе гемобластозов [1]. Наконец, гипометилирование гена *MIR-143* может являться специфичной для клеток ДВККЛ характеристикой и напрямую участвовать в формировании опухолевого фе-

нотипа. Последнее предположение основано на данных, свидетельствующих о неоднозначности роли *miR-143* в онкогенезе. Так, несмотря на сообщения о ее онкосупрессорной функции, при ряде злокачественных неоплазий показано селективное преимущество клеток, имеющих высокие уровни экспрессии *miR-143*. Также установлено, что мишенями данной микроРНК является ряд супрессоров опухолевого роста, значимых в лимфогенезе, а именно обладающие проапоптотической активностью (белки PUMA и ITM2B), препятствующие мезенхимально-сосудистому переходу (интегрин ITGA7) и ангиогенезу (фактор VASH1) [17].

Известно, что метилированные последовательности очень редко полностью выключают экспрессию генов, обычно они затрудняют работу осуществляющих ее механизмов. Таким образом, чем сильнее метилированы СрG-островки в районе промотора или сайта начала транскрипции, тем меньше транскрибируется мРНК, и наоборот. При этом не все СрG-островки и СрG-сайты в одинаковой мере определяют процессы транскрипции. Обнаружено, что некоторые из них действуют как высокоактивные инициаторы

экспрессии гена и с большей частотой обнаруживаются в клетках неметилированными [18].

В этой связи интересными представляются как данные о неоднородности изменений паттерна метилирования *MIR-143* в опухолевых и здоровых клетках человека по данным ранее проведенных исследований [10], так и наше наблюдение о преимущественном гипометилировании в опухолевой ткани ДВККЛ одного из четырех анализируемых CpG-динуклеотидов в анализируемом нами фрагменте CpG-островка гена.

Заключение

В проведенной работе получены данные об изменении паттерна метилирования гена *MIR-143* в опухолевой ткани ДВККЛ, заключающемся в неравнозначном гипометилировании CpG-динуклеотидов в пределах анализируемого фрагмента. Различная примесь в анализируемых образцах клеток мезинхимального происхождения лишь отчасти может объяснить наблюдаемые различия в уровне метилирования гена в ткани реактивных и опухолевых лимфоузлов. Требуется дальнейшие исследования, направленные на уточнение механизмов эпигенетической регуляции экспрессии *miR-143* в лимфомных клетках, и идентификация ее мРНК-мишеней для прояснения роли данной микроРНК в патогенезе ДВККЛ.

Список литературы / References

1. Кабанов И.Н., Тищенко Л.И. Изменение метилирования ДНК повторяющихся последовательностей и однокопийных генов при онкологических и некоторых других заболеваниях человека. *Вестн. СПбГУ*. 2014;3(3):62–83.

Kabanov I.N., Tishchenko L.I. Changing the DNA methylation of repetitive sequences and single-copy genes in cancer and other human diseases. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = Bulletin of Saint-Petersburg University*. 2014;3(3):62–83. [In Russian].

2. Loginov V.I., Burdennyu A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A. The role of promoter DNA methylation of six cancer-associated miRNA genes in ovarian cancer development and progression. *Biotechnol. Appl.* 2016;33(3):3211–3215.

3. Piletič K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch. Toxicol.* 2016;90(10):2405–2419. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7

4. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Березина О.В., Чуркина М.И., Гуражева А.А., Максимов В.Н. Метилирование генов p53-респонзивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах.

Сиб. онкол. ж. 2022;21(2):130–142. doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142

Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Berezina O.V., Churkina M.I., Gurazheva A.A., Maksimov V.N. Methylation of p53-responsive oncosuppressive microRNA genes in hemoblastosis. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2022;21(2):130–142. [In Russian]. doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142

5. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Orlov Y.L., Churkina M.I., Berezina O.V., Gurazheva A.A., Ageeva T.A., Seregina O.B., Maksimov V.N. The methylation of the p53 targets the genes *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* and *MIR-34B/C* in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma. *Genes (Basel)*. 2022;13(8):1401. doi: 10.3390/genes13081401

6. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И., Гуражева А.А., Воевода М.И., Максимов В.Н. Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. *Мед. генет.* 2022;21(11):62–66. doi: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66

Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I., Gurazheva A.A., Voevoda M.I., Maximov V.N. Complex analysis of p53-responsive microRNA genes methylation and TP53 gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*. 2022;21(11):62–66. [In Russian]. doi: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66

7. Akao Y., Nakagawa Y., Kitade Y., Kinoshita T., Naoe T. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci.* 2007;98(12):1914–1920. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00618.x

8. Roehle A., Hoefig K.P., Repsilber D., Thorns C., Ziepert M., Wesche K.O., Thiere M., Loeffler M., Klapper W., Pfreundschuh M., ... Feller A.C. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br. J. Haematol.* 2008;142(5):732–744. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07237.x

9. Chen W., Lang Z., Ren C., Yang P., Zhang B. MiR-143 acts as a novel Big mitogen activated protein kinase 1 suppressor and may inhibit invasion of glioma. *Oncol. Rep.* 2019;42(3):1194–1204. doi: 10.3892/or.2019.7218

10. Dou L., Zheng D., Li J., Li Y., Gao L., Wang L., Yu L. Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression. *Oncogene*. 2012;31(4):507–517. doi: 10.1038/onc.2011.248

11. Jiang M., Zhang Y., Fei J., Chang X., Fan W., Qian X., Zhang T., Lu D. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab. Invest.* 2010;90(2):282–290. doi: 10.1038/labinvest.2009.132

12. Drosou V., Kapazoglou A., Letsiou S., Tsaftaris A.S., Argiriou A. Drought induces variation in the DNA

methylation status of the barley HvDME promoter. *J. Plant. Res.* 2021;134(6):1351–1362. doi: 10.1007/s10265-021-01342-z

13. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(13):E65–5. doi: 10.1093/nar/29.13.e65

14. Lawrie C.H., Chi J., Taylor S., Tramonti D., Ballabio E., Palazzo S., Saunders N.J., Pezzella F., Boultonwood J., Wainscoat J.S., Hatton C.S.R. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13(7):1248–1260. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00628.x

15. Kent O.A., McCall M.N., Cornish T.C., Halushka M.K. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Research.* 2014;42(12):7528–7538. doi: 10.1093/nar/gku461

16. Song Y., van den Berg P.R., Markoulaki S., Soldner F., Dall'Agnese A., Henninger J.E., Drotar J., Rosenau N., Cohen M.A., Young R.A., ... Jaenisch R. Dynamic enhancer DNA methylation as basis for transcriptional and cellular heterogeneity of ESCs. *Mol. Cell.* 2019;75(5):905–920.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.045

17. Lozada-Delgado E.L., Grafals-Ruiz N., Miranda-Román M.A., Santana-Rivera Y., Valiyeva F., Rivera-Díaz M., Marcos-Martínez M.J., Vivas-Mejía P.E. Targeting MicroRNA-143 leads to inhibition of glioblastoma tumor progression. *Cancers (Basel).* 2018;10(10):382. doi: 10.3390/cancers10100382

18. Yoon S., Choi E.H., Park S.J., Kim K.P. α -Kleisin subunit of cohesin preserves the genome integrity of embryonic stem cells. *BMB Rep.* 2023;56(2):108–113. doi: 10.5483/BMBRep.2022-0106

Сведения об авторах:

Воропаева Елена Николаевна, д.м.н., ORCID: 0000-0001-7542-7285, e-mail: vena.81@mail.ru

Поспелова Татьяна Ивановна, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-1261-5470, e-mail: postatgem@mail.ru

Нестерец Алина Михайловна, к.м.н., ORCID: 0000-0002-1432-0473, e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

Чуркина Мария Игоревна, ORCID: 0000-0002-1301-5944, e-mail: nats.sagan@yandex.ru

Березина Ольга Валерьевна, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4584-658X, e-mail: ovb-mail@ya.ru

Максимов Владимир Николаевич, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-7165-4496, e-mail: medik11@mail.ru

Information about the authors:

Elena N. Voropaeva, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-7542-7285, e-mail: vena.81@mail.ru

Tatyana I. Pospelova, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-1261-5470, e-mail: postatgem@mail.ru

Alina M. Nesterets, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1432-0473, e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

Maria I. Churkina, ORCID: 0000-0002-1301-5944, e-mail: nats.sagan@yandex.ru

Olga V. Berezina, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4584-658X, e-mail: ovb-mail@ya.ru

Vladimir N. Maksimov doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-7165-4496, e-mail: medik11@mail.ru

Поступила в редакцию 14.06.2022

После доработки 04.07.2023

Принята к публикации 21.07.2023

Received 14.06.2022

Revision received 04.07.2023

Accepted 21.07.2023