

## Связь экспрессии BMI-1 и ROR1 с клинико-морфологическими параметрами и течением люминального рака молочной железы

В.О. Тараканова<sup>1, 2</sup>, Н.В. Крахмаль<sup>1, 2</sup>, Н.Н. Бабышкина<sup>1, 2</sup>, С.В. Вторушин<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**Введение.** Люминальный рак молочной железы (РМЖ) занимает наибольшую долю в структуре всего молекулярного ландшафта данного заболевания. На фоне проводимого, чаще всего гормонального, лечения у части пациентов развивается прогрессия заболевания, что диктует поиск новых молекулярных предикторов.

**Цель исследования.** Изучить клинико-морфологические особенности заболевания в зависимости от экспрессии BMI-1 и ROR1 в первичной опухоли у больных с люминальным раком молочной железы на фоне терапии ингибиторами ароматазы.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 80 пациенток с T1-2No-1Mo стадиями первично-операбельного РМЖ в возрасте  $62.1 \pm 8.1$  года. Изучалась ткань первичной опухоли методом иммуногистохимии. Применяли антитела к ROR1 и BMI-1. Оценивалось наличие и степень выраженности иммунного окрашивания, процент позитивно окрашенных опухолевых клеток. Экспрессионные параметры исследуемых маркеров оценивались в связи с различными клинико-патологическими параметрами заболевания.

**Результаты.** 70 пациенток имели люминальный А подтип, 10 пациенток – люминальный В/HER2-отрицательный субтип. Позитивная экспрессия BMI-1 наблюдалась в 64 % случаев, экспрессия ROR1 встречалась реже и составила 24 %. При нарастании степени злокачественности опухоли (grade) увеличивается число случаев с позитивной экспрессией фактора ROR1 ( $p < 0.05$ ). Уровень пролиферативной активности опухоли (Ki67) коррелировал с позитивной экспрессией ROR1 ( $p = 0.312$ ,  $p = 0.03$ ) и BMI-1 ( $p = 0.310$ ,  $p < 0.031$ ). При наличии метастатического поражения регионарных лимфатических узлов экспрессия обоих показателей была достоверно выше. Возникновение отдаленных метастазов сопряжено с высокими уровнем экспрессии BMI-1 клетками первичной опухоли ( $p < 0.05$ ).

**Заключение.** Проведенное исследование отчетливо демонстрирует взаимосвязь протеинов ROR1 и BMI-1 с клинико-патологическими параметрами первичной опухоли и течением заболевания при люминальных молекулярных подтипах рака молочной железы.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, BMI-1, ROR1, иммуногистохимия.

**Образец цитирования:** Тараканова В.О., Крахмаль Н.В., Бабышкина Н.Н., Вторушин С.В. Связь экспрессии BMI-1 и ROR1 с клинико-морфологическими параметрами и течением люминального рака молочной железы // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(1):88-99. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-1-88-99

Поступила в редакцию 30.11.2023  
Прошла рецензирование 20.02.2024  
Принята к публикации 10.03.2024

Автор, ответственный за переписку

Тараканова Валерия Олеговна: НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5.  
E-mail: valeria.ssmu@gmail.com

Received 30.11.2023  
Revised 20.02.2024  
Accepted 10.03.2024

Corresponding author

Valeriia O. Tarakanova: Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 5, Kooperativny str., Tomsk, 634009, Russia.  
E-mail: valeria.ssmu@gmail.com

## Correlation of BMI-1 and ROR1 expression with clinical and morphological parameters and the course of luminal breast cancer

V.O. Tarakanova<sup>1,2</sup>, N.V. Krakhmal<sup>1,2</sup>, N.N. Babyshkina<sup>1,2</sup>, S.V. Vtorushin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

### ABSTRACT

**Introduction.** Luminal breast cancer (BC) occupies the largest proportion in the structure of the entire molecular landscape of this disease. During the ongoing treatment, most often hormone therapy, in part of patients, the disease progression develops, which makes necessary the search for new molecular predictors.

**Aim of the research.** To study the clinical and morphological features of the disease depending on BMI-1 and ROR1 expression in the primary tumor in luminal breast cancer patients during aromatase inhibitors therapy.

**Materials and methods.** The study included 80 patients with T1-2No-1Mo operable primary breast cancer at the age of  $62.1 \pm 8.1$  years. The primary tumor tissue was studied using immunohistochemistry. Antibodies to ROR1 and BMI-1 were used. The presence and degree of immunostaining, and the percentage of positively stained tumor cells were assessed. The expression parameters of the studied markers were assessed in relation to various clinical and pathological data of the disease.

**Results.** 70 patients had the luminal A subtype, 10 patients had the luminal B/HER2-negative subtype. Positive BMI-1 expression was observed in 64% of cases, ROR1 expression was less common and amounted to 24%. As tumor grade increases, the number of cases with positive ROR1 expression increases ( $p < 0.05$ ). The level of proliferative activity (Ki67) correlated with positive ROR1 expression ( $p = 0.312$ ,  $p = 0.03$ ) and BMI-1 ( $p = 0.310$ ,  $p < 0.031$ ). In presence of metastases to regional lymph nodes, the expression of both markers was significantly higher. The occurrence of distant metastases is associated with high levels of BMI-1 expression by primary tumor cells ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** The study clearly demonstrates the correlation of ROR1 and BMI-1 proteins with the clinical and morphological parameters of the primary tumor and the course of the disease in luminal subtypes of breast cancer.

**Keywords:** breast cancer, BMI-1, ROR1, immunohistochemistry.

**Citation example:** Tarakanova V.O., Krakhmal' N.V., Babyshkina N.N., Vtorushin S.V. Correlation of BMI-1 and ROR1 expression with clinical and morphologic parameters and the course of luminal breast cancer. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(1):88-99. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-1-88-99

### ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (ПМЖ) занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний среди женщин. Несмотря на достигнутые успехи в лечении данного заболевания, остается актуальным поиск и изучение различных биологических маркеров, выступающих в качестве потенциальных кандидатов факторов прогноза и предикции ответа на проводимое лечение.

Рецепторная тирозинкиназа ROR1 является рецептором для субъединицы Wnt5a Wnt-сигнального пути. Частота ее экспрессии в нормальных клетках очень высока в процессе эмбриогенеза, но также повышается при многих злокачественных новообразованиях [1–3]. Описаны три основных сплайс-варианта ROR1: вариант 1 (v1; UniProt IDQ01973-1) кодирует трансмембранный белок, состоящий из 934 аминокис-

### INTRODUCTION

Breast cancer (BC) occupies a leading position in the structure of oncological diseases among women. Despite the advances in the treatment of this disease, the search for various biological markers that act as potential candidates for factors of prognosis and prediction of response to treatment and their studying remains relevant.

The receptor tyrosine kinase ROR1 is the Wnt5a protein receptor of the Wnt signaling pathway. The level of its expression in normal cells is very high during embryogenesis, but also increases in many malignant neoplasms [1–3]. Three major splice variants of ROR1 have been described: variant 1 (v1; UniProt IDQ01973-1) encodes a transmembrane protein consisting of 934 amino acids expressed on the cell surface; variant 2 (v2; UniProt IDQ01973-2) lacks the amino terminus of 549 amino acids; intracellular/secreted variant 3 (v3; UniProt IDQ01973-3),

лот, экспрессируемых на клеточной поверхности; вариант 2 (v2; UniProt IDQ01973-2) лишен amino-конца из 549 аминокислот; внутриклеточный/секретируемый вариант 3 (v3; UniProt IDQ01973-3), который предположительно кодирует amino-конец из 393 аминокислот [4].

Впервые экспрессию ROR1 во многих злокачественных новообразованиях, таких как В-клеточный хронический лейкоз, рак яичников, РМЖ, легких, обнаружили при помощи транскрипционного анализа [5, 6]. Иммуногистохимический метод исследования (ИГХ) как замороженных образцов опухолевой ткани, так и фиксированных формалином и залитых парафином блоков с применением антител, тропных к N-концевой области ROR1, также помог обнаружить экспрессию данной тирозинкиназы в солидных опухолях. Но в большинстве исследований удалось выявить экспрессию цитоплазматически расположенной ROR1, а не на поверхности клетки, как это ожидалось в начале исследования [1].

Экспрессия ROR1 изучалась в образцах здоровой ткани при помощи различных методов, включая транскриптомные техники, иммуноблоттинг и ИГХ. При помощи цитометрии было показано, что ROR1 присутствует на клеточной поверхности адипоцитов, дифференцированных *in vitro* из клеток-предшественников, и на поверхности нормальных В-клеток костного мозга [7]. Различные специфичные к ROR1 антитела использовались для обнаружения данного белка в клетках нормальных тканей при помощи ИГХ и иммуноблоттинга [8–10]. Данные исследования пришли к разным результатам, но были едины в одном: ROR1-v1 избирательно экспрессируется в опухолевых клетках, но не в здоровых.

Группа исследователей (А. Balakrishnan et al.) изучали эффективность изобретенного ими антитела 6D4 mAb, тропного к карбокси-концу ROR1, при проведении ИГХ. Они показали, что ROR1 гомогенно экспрессируется в тканях тройного негативного рака молочной железы, рака яичников и легкого. Также выявили некоторую экспрессию данного белка в здоровых тканях, таких как паращитовидные железы, островки поджелудочной железы, слизистая пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки [9].

Ряд исследований показали, что при раке молочной железы экспрессия ROR1 была связана с высоким уровнем пролиферации опухолевых клеток, ускользанием от апоптоза и склонностью к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [12].

which is proposed to encode the amino terminus of 393 amino acids [4].

For the first time, ROR1 expression in many malignant neoplasms, such as B-cell chronic leukemia, ovarian cancer, BC, lung cancer, was discovered using transcriptional analysis [5, 6]. Immunohistochemistry (IHC) of both frozen tumor tissue samples and formalin-fixed, paraffin-embedded blocks using antibodies to the N-terminal region of ROR1 also helped detect the expression of this tyrosine kinase in solid tumors. But most studies were able to detect the expression of ROR1 located in the cytoplasm, and not on the cell surface, as expected at the beginning of studying [1].

ROR1 expression has been studied in healthy tissue samples using a variety of methods, including transcriptomic techniques, immunoblotting, and IHC. Using cytometry, ROR1 has been shown to be present on the cell surface of adipocytes differentiated from progenitor cells *in vitro* and on the surface of normal bone marrow B cells [7]. Various ROR1-specific antibodies have been used to detect this protein in normal tissue cells using IHC and immunoblotting [4, 8–10]. These studies came to different results, but were unanimous in one thing: ROR1-v1 is selectively expressed in tumor cells, but not in healthy ones.

A group of researchers (Balakrishnan et al.) studied the effectiveness of their developed 6D4 monoclonal antibody which is tropic to the carboxy terminus of ROR1, by IHC. They showed that ROR1 is homogeneously expressed in the tissues of triple negative breast cancer, ovarian cancer, and lung adenocarcinomas. Some expression of this protein was also detected in normal tissues, including parathyroid, pancreatic islets, esophageal, gastric and duodenal mucosa [9].

A number of studies have shown that in breast cancer, ROR1 expression was associated with high levels of tumor cell proliferation, escape from apoptosis, and susceptibility to epithelial-mesenchymal transition (EMT) [10].

Pandey et al. showed that ROR1 expression was most often found in the triple negative subtype of breast cancer, the luminal A subtype was in second place, less often in HER2-positive breast cancer and the luminal B subtype. The researchers also showed that the high levels of expression of this protein were associated with worse survival without distant metastasis. An association has also been shown between ROR1 expression and the level of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) expression. The possibility has been noted that ROR1 maintains FGFR1 expression, which, in turn,

G. Pandey et al. показали, что экспрессия ROR1 чаще всего встречалась при тройном негативном подтипе рака молочной железы, на втором месте оказался люминальный А подтип, реже – при HER2-положительном РМЖ и люминальном В подтипе. Также исследователи показали, что высокие показатели экспрессии данного белка были связаны с худшей выживаемостью без отдаленного метастазирования. Также была показана связь между экспрессией ROR1 и уровнем экспрессии рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1). Была отмечена вероятность того, что ROR1 поддерживает экспрессию FGFR1, что, в свою очередь, определяет максимально злокачественное течение тройного негативного РМЖ [11].

М.К. Hasan et al. представили данные о том, что Wnt5a индуцирует ROR1, что приводит к рекрутированию кортактина. Кортактин играет важную роль в процессе межклеточной адгезии – следовательно, его рекрутирование способствует клеточной миграции и появлению отдаленных метастазов при РМЖ. Из этого можно сделать вывод, что экспрессия ROR1 в клетках РМЖ будет связана с высоким риском отдаленного метастазирования и худшим прогнозом [12].

При связывании ROR1 с белком Wnt5a Wnt-сигнального пути запускается каскад реакций, способных привести к активации белка BMI-1. Белок BMI-1 относится к семейству polycomb, играющему немаловажную роль в процессах запрограммированной клеточной гибели, старении клеток, способности восстанавливать ДНК, поддерживать рост и пролиферацию опухолевых клеток. В норме BMI-1 потенцирует нейрональные стволовые клетки и гемопоэтические клетки для участия в процессах дифференцировки и обновления [13].

В ряде исследований было показано, что BMI-1 запускается при активации PI3K/AKT-сигнального пути. И BMI-1, и AKT коактивируются в значительной части опухолей с высоким злокачественным потенциалом. AKT опосредует фосфорилирование белка BMI-1, усиливая тем самым его онкогенный потенциал. Этот процесс модулирует ответ на повреждение ДНК и влияет на стабильность генома, нарушая ее.

Другое независимое исследование показало, что фосфорилирование BMI-1 при помощи AKT также может модулировать его функцию через другой сигнальный путь – Ink/Arf. Фосфорилирование BMI-1 человека по Ser316 с помощью AKT нарушало его функцию, вызывая диссоциацию от локуса Ink4a/Arf, что приводило к сниже-

determines the great malignancy of triple negative BC [11].

Hasan et al. presented evidence that Wnt5a induces ROR1, which leads to the recruitment of cortactin. Cortactin plays an important role in the process of intercellular adhesion; therefore, its recruitment promotes cell migration and the appearance of distant metastases in breast cancer. From this we can conclude that ROR1 expression in breast cancer cells will be associated with a high risk of distant metastasis and a worse prognosis [12].

When ROR1 binds to the Wnt5a protein of the Wnt signaling pathway, a cascade of reactions is triggered that can lead to the activation of the BMI-1 protein. The BMI-1 protein belongs to the Polycomb group proteins, which plays a not unimportant part in programmed cell death, cell aging, DNA repair capacity, and maintaining the growth and proliferation of tumor cells. Normally, BMI-1 activates neural stem cells and hematopoietic cells to participate in differentiation and renewal [13].

A number of studies have shown that BMI-1 is triggered by activation of the PI3K/AKT signaling pathway. Both BMI-1 and AKT are co-activated in the majority of high-grade tumors. AKT mediates phosphorylation of the BMI-1 protein, thereby enhancing its malignant potential. This process modulates DNA damage response and affects genomic stability by disordering it.

Another independent study showed that phosphorylation of BMI-1 by AKT may also modulate its function via another signaling pathway, Ink/Arf. Phosphorylation of human BMI-1 via Ser316 by AKT impaired its function, causing dissociation from the Ink4a/Arf locus, resulting in decreased ubiquitylation of histone H2A and the inability of BMI-1 to promote cell proliferation and tumor growth [14]. Moreover, AKT-mediated phosphorylation of BMI-1 also inhibits its ability to promote self-renewal of hematopoietic stem and progenitor cells. These studies reveal the mechanism of increased p16Ink4a and p14Arf subunits observed in cancer cells with activated phosphoinositide 3-kinase (PI3K/AKT) signaling pathway and identify the crosstalk between phosphorylation events and the chromatin structure. Together, these data indicate context-dependent variability in the functional outcome of phosphorylated BMI-1.

A number of studies have shown that high levels of BMI-1 expression are observed in breast cancer, which, in turn, correlated with dramatic progression and poor prognosis. It was noted that this protein plays quite an important role in tumor invasion and metastasis by modulating the expression of EMT

нию убиквитинирования гистона H2A и способности BMI-1 стимулировать клеточную пролиферацию и рост опухоли [14]. Более того, АКТ-опосредованное фосфорилирование BMI-1 также ингибирует его возможность способствовать самообновлению гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников. Эти исследования раскрывают механизм повышенного содержания p16Ink4a и p14Arf субъединиц, наблюдаемого в раковых клетках с активированным сигнальным путем фосфоинозитид-3-киназы (PI3K/АКТ), и определяют перекрестные помехи между событиями фосфорилирования и структурой хроматина. Вместе эти данные указывают на зависящую от контекста изменчивость функционального результата фосфорилированного BMI-1.

Ряд исследований показали, что при раке молочной железы наблюдаются высокие уровни экспрессии BMI-1, что, в свою очередь, коррелировало с агрессивным течением опухоли и неблагоприятным прогнозом. Было отмечено, что данный белок играет немаловажную роль в инвазии и метастазировании опухолей, модулируя экспрессию белков ЭМП. *In vitro* и *in vivo* белок BMI-1 показал важную роль в формировании высокой онкогенности клеточных линий РМЖ. Также коллаборация BMI-1 и HRAS приводит к крайне злокачественному фенотипу РМЖ, повышает процент отдаленного метастазирования в печень, селезенку, головной мозг [15].

J.Y. Liu et al. в своем исследовании приводят интересные данные о том, что стимулирующие рост опухоли эффекты, обусловленные активацией BMI-1, отличаются в клеточных линиях различных молекулярных подтипов РМЖ. Авторы показали, что при люминальном А подтипе РМЖ BMI-1 способствует пролиферации опухолевых клеток посредством ингибирования транскрипции CDKN2D, при тройном негативном подтипе это происходит за счет ингибирования транскрипции BRCA1 [16]. В люминальных клетках рака молочной железы подтипа А авторы сосредоточились на CDKN2D (p19INK4d), который принадлежит к семейству белков INK4, ингибиторов CDK4. Семейство INK4 состоит из CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C и CDKN2D, которые связываются с CDK4 и CDK6 и специфически ингибируют активность киназы pRb комплексов циклин D-CDK4 и циклин D-CDK6, чтобы регулировать фазовый переход G1-S. Гены семейства *INK4* действуют как опухолевые супрессоры в патогенезе многих злокачественных новообразований, включая лейкемию [17], и обеспечивают прямую

proteins. *In vitro* and *in vivo*, the BMI-1 protein showed a substantial role in the formation of high carcinogenicity of BC cell lines. Also, BMI-1 and HRAS co-expression leads to an extremely malignant phenotype of BC and increases distant metastasis to the liver, spleen, and brain [15].

Liu et al. provide data of interest that effects promoting tumor and caused by BMI-1 activation differ in cell lines of different molecular subtypes of BC. The authors showed that in the luminal A subtype of breast cancer, BMI-1 promotes tumor cells proliferation by inhibiting the transcription of CDKN2D; in the triple negative subtype, this occurs by inhibiting the transcription of BRCA1 [16]. In luminal A subtype breast cancer cells, the authors focused on CDKN2D (p19INK4d), which belongs to the INK4 family, CDK4 inhibitors. The *INK4* family consists of CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, and CDKN2D, which bind to CDK4 and CDK6 and specifically inhibit the pRb kinase activity of the cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes to regulate the G1-S phase transition. INK4 family genes act as tumor suppressors in the pathogenesis of many malignancies, including leukemia [17], and provide a direct correlation between tumorigenesis and loss of damping mechanisms. Wang et al. found that PML/RAR $\alpha$  can impair both proliferation and differentiation by suppressing the expression of CDKN2D, thereby promoting the development of acute promyelocytic leukemia [18]. However, the role of CDKN2D in breast cancer has not been widely studied. Liu et al. showed that BMI-1 may function by inhibiting CDKN2D, thereby suggesting that CDKN2D may serve as a target gene for BMI-1 in luminal A breast cancer. The researchers also determined mRNA levels of BMI-1 in normal tissue cells and tumor cells of the mammary gland. It was shown that BMI-1 levels were significantly higher in breast carcinomas [16]. Using immunofluorescence analysis, the expression of this protein in triple-negative BC and luminal A subtypes was studied. Both molecular subtypes of BC showed increased levels of BMI-1 expression, even though luminal A subtype tumors generally have more favorable prognosis [19]. These results confirmed the data of previous studies indicating significantly high levels of BMI1 expression in breast malignancies [15]. This study showed that BMI-1 expression was significantly upregulated in breast cancer tissues compared to normal tissues at both mRNA and protein levels. Loss-of-function experiments confirmed that BMI-1 expression downregulation could inhibit proliferation and migration of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. These findings indicate that

связь между онкогенезом и потерей негативного контроля прогрессирующего клеточного цикла. Y. Wang et al. обнаружили, что PML/RAR $\alpha$  может нарушать как пролиферацию, так и дифференцировку путем подавления экспрессии CDKN2D, тем самым способствуя патогенезу острого промиелоцитарного лейкоза [18]. Однако роль CDKN2D в развитии рака молочной железы широко не изучалась. J.Y. Liu et al. показали, что BMI-1 может функционировать, ингибируя CDKN2D, тем самым предполагая, что CDKN2D может служить геном-мишенью BMI-1 при люминальном подтипе А раке молочной железы. Также исследователи определили уровни мРНК BMI-1 в здоровых клетках молочной железы и в клетках опухолей. Было показано, что уровни BMI-1 были значительно выше при карциномах молочной железы [16]. С помощью иммунофлюоресцентного метода была изучена экспрессия данного белка при трижды негативном РМЖ и люминальном А подтипе. В обоих молекулярных подтипах РМЖ были выявлены повышенные уровни экспрессии BMI-1 даже несмотря на то, что опухоли люминального А подтипа обычно характеризуются более благоприятным прогнозом [19]. Эти результаты подтвердили данные предыдущих исследований, говорящих о статистически значимо высоких уровнях экспрессии белка при злокачественных новообразованиях молочной железы [15]. Данное исследование показало, что экспрессия BMI-1 была значительно повышена в тканях рака молочной железы по сравнению со здоровыми тканями как на уровне мРНК, так и на уровне определения самого белка. Анализы потери функции подтвердили, что снижение экспрессии BMI-1 может ингибировать пролиферацию и миграцию клеток рака молочной железы *in vitro* и *in vivo*. Эти данные показывают, что BMI-1 действует как онкоген в развитии рака молочной железы.

Исходя из существующих фундаментальных данных о роли белков BMI-1 и ROR1 при злокачественных новообразованиях, представляет несомненный интерес комплексное изучение данных факторов в отношении клинических и морфологических параметров заболевания у больных раком молочной железы.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить клинико-морфологические особенности заболевания в зависимости от экспрессии BMI-1 и ROR1 в первичной опухоли у больных с люминальным раком молочной железы на фоне терапии ингибиторами ароматазы.

BMI-1 acts as an oncogene in the breast cancer development.

Based on the current essential data on the role of BMI-1 and ROR1 proteins in malignant neoplasms, a comprehensive study of these factors in relation to the clinical and morphological parameters of the disease in patients with breast cancer is of undoubted interest.

## AIM OF THE RESEARCH

To study the clinical and morphological features of the disease depending on BMI-1 and ROR1 expression in the primary tumor in patients with luminal breast cancer during aromatase inhibitor therapy.

## MATERIALS AND METHODS

A study included 80 patients with T1-2N0-1M0 primary operable BC who were treated in the Department of Oncology of the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (TNRMC). The mean age of the patients was  $62.1 \pm 8.1$  years. Inclusion criteria for the study were: histologically confirmed luminal HER2-negative BC, adjuvant treatment with aromatase inhibitors, and postmenopause. Exclusion criteria were: preoperative treatment, adjuvant chemotherapy, multiple primary malignant tumors. The study was approved by the local Ethics Committee of the Cancer Research Institute of the TNRMC. All patients underwent surgical treatment including mastectomy or lumpectomy, radiation therapy and adjuvant hormone therapy with aromatase inhibitors. Staging of BC was performed according to the TNM classification (7th edition). The follow-up was at least 3 years. A morphological study of the samples was carried out. The primary tumor tissue and resected axillary lymph nodes were examined. We used a Nikon ECLIPSE Ni light microscope. The diagnosis was made according to the WHO Classification of Tumors of the Breast, 5th Revision (2019). Analysis of ROR1 and BMI-1 expression in the primary tumor was performed on paraffin sections with IHC method using a Bond-MAX (Leica Biosystem) automated staining system. Antibodies to ROR1 (ROR1 antibody, polyclonal, 1:100, ThermoFisher) and BMI-1 (BMI-1 antibody, polyclonal, 1:100, ThermoFisher) were used. Proliferative activity of tumor species was assessed by Ki67 staining (clone SP6, Cell Marque). In each case, the presence and intensity of staining and the percentage of positive staining for ROR1 and BMI1 were assessed.

Statistical analysis of the data was carried out using Statistica 10.0 software. Normally distributed data were checked using the Kolmogorov-Smirnov

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 80 пациенток с T1-2No-1Mo стадиями первично-операбельного РМЖ, проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра (ТНИМЦ). Средний возраст больных составил  $62.1 \pm 8.1$  года. Критериями включения в исследование были гистологически подтвержденный люминальный HER2-негативный РМЖ, адъювантное лечение ингибиторами ароматазы, постменопауза. Критерии исключения: предоперационное лечение, адъювантная химиотерапия, первично-множественные злокачественные опухоли. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии ТНИМЦ. Все пациентки получали оперативное лечение в объеме мастэктомии или секторальной резекции, лучевой терапии и адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы. Распространенность онкологического заболевания определялась согласно международной классификации TNM (7-е издание). Сроки наблюдения за больными составили не менее 3 лет. Проводили морфологическое исследование операционного материала. Изучалась ткань первичной опухоли и удаленные аксиллярные лимфатические узлы. Исследование проводилось с помощью светового микроскопа Nikon ECLIPSE Ni. Диагноз устанавливался согласно «Классификации опухолей молочной железы, 5-й пересмотр» (ВОЗ, 2019). Анализ экспрессии белков ROR1 и BMI-1 в первичной опухоли проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим способом. Исследование выполнялось на автоматическом иммуногистостейнере Bond-MAX (Leica Biosystem). Применяли антитела к ROR1 (ROR1 antibody, polyclonal, 1:100, ThermoFisher) и BMI-1 (BMI-1 antibody, polyclonal, 1:100, ThermoFisher). Пролиферативную активность опухоли оценивали по уровню экспрессии Ki67 (clone SP6, Cell Marque). В каждом случае оценивалось наличие и степень выраженности иммунного окрашивания, процент позитивно окрашенных опухолевых клеток.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета программ Statistica 10.0. Нормальность распределения признаков в выборке проверяли с использованием теста Колмогорова – Смирнова. Для переменных с ненормальным распределением использован тест Манна – Уитни, представлены значения медианы (Me), 25-го и 75-го квартиля (Q1; Q3). Для выявления взаимосвязей между двумя количественными показателями оценивали ранговый

test. For non-normally distributed data, the Mann-Whitney test was used. The values are presented as a median (Me), 25th and 75th quartiles (Q1; Q3). To identify relationships between two quantitative variables, the Spearman's rank correlation coefficient was used. Differences between the variables were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

In the study group, 70 patients had the luminal A subtype, 10 patients – the luminal B/HER2-negative subtype. In 67 patients, the primary tumor was presented by nonspecific invasive carcinoma; in 13 cases, invasive lobular cancer was diagnosed. Based on the results of immunohistochemical tests for the studied proteins, a retrospective comparison of the expression level of ROR1 and BMI-1 with the clinical and morphological parameters of the primary tumor was carried out: size, stage, grade, regional lymph node involvement and distant metastases. According to the results of immunohistochemistry, positive staining for BMI-1 was observed in 64% of cases, positive staining for ROR1 was less common and amounted to 24% of cases.

It was shown that in the group of patients with positive staining for BMI-1 in carcinoma cells, the size of the primary site was significantly larger compared to the group of patients with negative staining for BMI-1 (Fig. 1) ( $p < 0.05$ ).

The stage of cancer did not differ significantly depending on the level of expression of the proteins in carcinoma cells. However, it was shown that with increasing the tumor grade, the number of cases with ROR1 expression increases (Fig. 2) ( $p < 0.05$ ). The level of tumor proliferative activity, evaluated by Ki67, correlated with the expression of ROR1 ( $\rho = 0.312$ ,  $p = 0.03$ ) and BMI-1 ( $\rho = 0.310$ ,  $p < 0.031$ ).

Regional lymph node metastases in breast cancer are an important factor that both determines the prognosis of the disease and influences the treatment tactics of patients. In the study group of patients, regional lymph node involvement was found in 16 patients. According to the results of our study, in the group of patients with regional lymph node metastases, the expression of both markers was significantly higher (Table 1).

During the follow-up (60 months), in 68 cases there were no signs of disease progression; in 12 cases, distant hematogenous metastases were registered. In 10 cases, patients had axial skeletal metastases, in 2 cases – visceral metastases. According to the data obtained, the occurrence of distant metastases revealed during the follow-up in patients with luminal A and luminal B/Her2-negative subtypes

коэффициент корреляции Спирмена. Различия между исследуемыми признаками считались статистически значимым при уровне  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследованной группе 70 пациенток имели люминальный А подтип, 10 пациенток – люминальный В/HER2-отрицательный молекулярный субтип. У 67 пациенток первичная опухоль была представлена инвазивной карциномой неспецифического типа, в 13 наблюдениях диагностирован инвазивный дольковый рак. На основе результатов проведенного ИГХ исследования изучаемых белков проводилось ретроспективное сопоставление уровня экспрессии ROR1 и BMI-1 с клинико-морфологическими параметрами первичной опухоли: размером первичной опухоли, стадией заболевания, степенью злокачественности (grade), статусом регионарных лимфатических узлов и фактом появления отдаленных метастазов. По результатам проведенного ИГХ исследования позитивная экспрессия BMI-1 наблюдалась в 64 % случаев, экспрессия ROR1 встречалась реже и составила в исследованной выборке 24 %.

Было показано, что в группе пациенток с позитивной экспрессией белка BMI-1 в клетках карциномы размер первичного опухолевого очага был достоверно больше в сравнении с группой больных, в опухоли которых не определялось иммунного окрашивания с антителом к BMI-1 (рис. 1) ( $p < 0.05$ ).

Стадия онкологического заболевания существенно не отличалась в зависимости от уровня

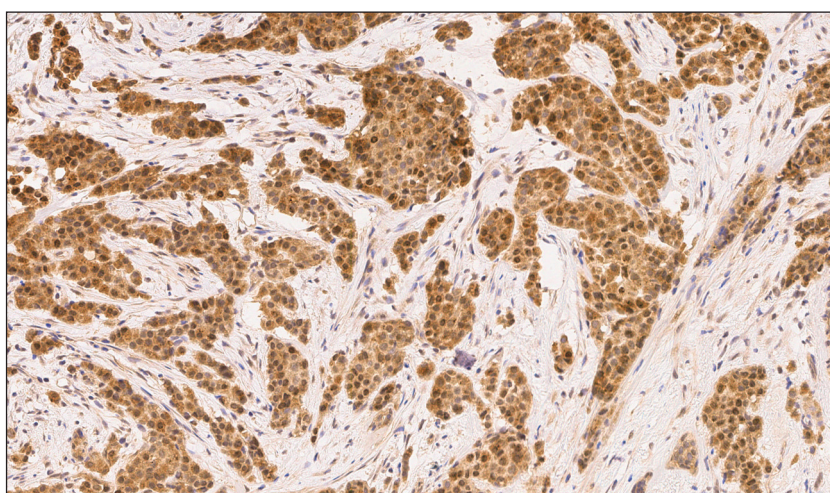
was associated with high levels of BMI-1 expression in primary tumor cells ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Luminal breast cancer which accounts for approximately 70% of all breast cancers is characterized by the expression of estrogen and/or progesterone receptors. Two proteins that have been shown to play an important role in the pathogenesis of luminal breast cancer are BMI-1 and ROR1.

In breast cancer, ROR1 is specifically expressed in luminal subtypes, but not in normal breast tissue or triple-negative breast cancer tissue [11, 16]. Our study showed that positive staining for BMI-1 was more common, while ROR1 expression was less frequently recorded. However, a dependence on the size of the primary tumor was found only for the BMI-1 protein. At the same time, both markers showed a correlation with the level of proliferative activity of tumor cells. This is most likely due to the fact that two oncogenic proteins can interact through both independent and overlapping mechanisms to promote proliferation, survival, invasion and therapy resistance in tumor [10, 12].

The correlation we discovered between the expression of the studied markers and the frequency of regional and distant metastasis in patients with luminal BC is most likely explained by the functional properties of these proteins, which are of importance in relation to both lymphogenous and hematogenous dissemination. ROR1, in particular, has been shown to activate invasion, EMT, and metastasis in luminal breast cancer models [12]. It should be emphasized that all patients included in the study had fairly simi-

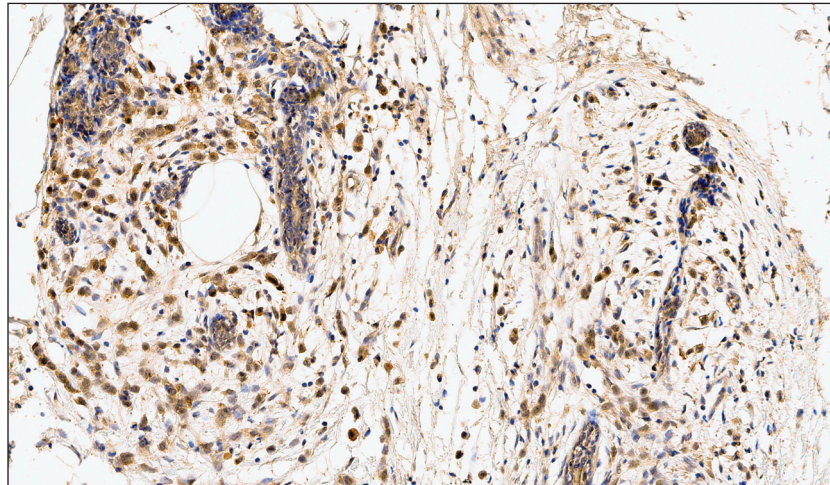


**Рис. 1.** Выраженная экспрессия BMI-1 в клетках рака молочной железы.

Инвазивная карцинома неспецифического типа. Иммуногистохимическое окрашивание. Увеличение (ув.)  $\times 200$

**Fig. 1.** High level expression of BMI-1 in breast cancer cells. Nonspecific invasive carcinoma.

Immunohistochemical staining. Magnification (magn.)  $\times 200$



**Рис. 2.** Умеренная экспрессия ROR1 в клетках рака молочной железы. Инвазивная дольковая карцинома, плеоморфный подтип. Иммуногистохимическое окрашивание. Ув.  $\times 200$

**Fig. 2.** Moderate level expression of ROR1 in breast cancer cells. Invasive pleomorphic lobular carcinoma. Immunohistochemical staining. Magn.  $\times 200$

экспрессии изучаемых белков в клетках карциномы. Однако было показано, что при нарастании степени злокачественности опухоли увеличивается число случаев с позитивной экспрессией фактора ROR1 (рис. 2) ( $p < 0.05$ ). Уровень пролиферативной активности опухоли, оцененный по маркеру Ki67, коррелировал с позитивной экспрессией ROR1 ( $\rho = 0.312$ ,  $p = 0.03$ ) и BMI-1 ( $\rho = 0.310$ ,  $p < 0.031$ ).

Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы является важным фактором, определяющим как прогноз заболевания, так и влияющим на тактику лечения пациентов. В исследуемой группе больных поражение регионарных лимфатических узлов опухолью было выявлено у 16 больных. По результатам нашего исследования было установлено, что в группе больных с наличием метастатического поражения регионарных лимфатических узлов экспрессия обоих показателей была достоверно выше (табл. 1).

За период наблюдения (60 мес) в 68 случаях признаков прогрессирования заболевания не

лар clinical characteristics and underwent the same treatment with aromatase inhibitors. It is possible that the disease progression during therapy with aromatase inhibitors is associated with the activation of mechanisms of tumor resistance to hormonal treatment, due to activation of the Wnt signaling pathway by ROR1 and BMI-1 proteins, and, possibly, transcriptional repression of CDKN2D [1, 3, 18].

The grade of breast carcinomas is an integral morphological indicator that reflects the degree of morphological and structural anaplasia of tumor during light microscopy. The correlation we have discovered between ROR-1 expression and the growth of carcinoma grade is consistent with the results of other studies [9].

Further studies are needed to fully elucidate the BMI-1/ROR-1 signaling axis and its potential as a therapeutic target in luminal breast cancer.

## CONCLUSION

The study clearly demonstrates the correlation of ROR1 and BMI-1 proteins with clinical and pathological parameters of the primary tumor and the

**Таблица 1.** Выраженность экспрессии (% Me (Q1–Q3)) белков BMI-1 и ROR1 в клетках первичной опухоли в зависимости от статуса лимфатических узлов у больных люминальным раком молочной железы

**Table 1.** Expression level (% Me (Q1–Q3)) of BMI-1 and ROR1 proteins in primary tumor cells depending on the status of lymph nodes in patients with luminal breast cancer

| Статус лимфатических узлов<br>Lymph node status | BMI-1        | ROR1        |
|-------------------------------------------------|--------------|-------------|
| N0 ( $n = 64$ )                                 | 14.0 (10–21) | 0 (0–16)    |
| N+ ( $n = 16$ )                                 | 27.0 (10–67) | 18.0 (0–49) |
| $p$                                             | 0.024        | 0.033       |

отмечено, в 12 случаях зарегистрировано появление отдаленных гематогенных метастазов. В 10 случаях у пациенток отмечалось метастатическое поражение скелета, в 2 наблюдениях были верифицированы висцеральные метастазы. Согласно полученным данным, возникновение отдаленных метастазов, диагностированных на этапах динамического наблюдения у больных люминальным А и люминальным В/Her2-негативным подтипами, было сопряжено с высокими уровнем экспрессии BMI-1 клетками первичной опухоли ( $p < 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Люминальный рак молочной железы, на долю которого приходится около 70 % всех диагностируемых случаев рака молочной железы, характеризуется экспрессией эстрогеновых и/или прогестероновых рецепторов. Два белка, которые, как выяснилось, играют важную роль в патогенезе люминального рака молочной железы, – это BMI-1 и ROR1.

При раке молочной железы ROR1 специфично экспрессируется в люминальных подтипах, но не в нормальной ткани молочной железы или в ткани, пораженной тройным негативным раком молочной железы [11, 16]. В нашем исследовании было показано, что чаще наблюдается позитивное окрашивание BMI-1, в то время как экспрессия ROR1 регистрировалась реже. При этом зависимость от размера первичной опухоли обнаружена только в отношении белка BMI-1. В то же время оба маркера показали связь с уровнем пролиферативной активности опухолевых клеток. Вероятнее всего, это обусловлено тем, что два онкогенных белка могут взаимодействовать посредством как независимых, так и перекрывающихся механизмов, чтобы стимулировать пролиферацию, выживание, инвазию и устойчивость к терапии [10, 12].

Обнаруженная нами связь экспрессии изученных маркеров с частотой регионарного и отдаленного метастазирования у больных люминальным РМЖ, вероятнее всего, объясняется функциональными свойствами данных белков, имеющих важное значение как в отношении лимфогенной, так и гематогенной диссеминации. Было показано, что, в частности, ROR1 стимулирует инвазию, ЭМП и метастазирование в моделях люминального рака молочной железы [12]. При этом следует подчеркнуть, что все пациенты, включенные в исследование, имели достаточно схожие клинические характеристики и одинаковое лечение ингибиторами ароматазы. Не исклю-

course of the disease in luminal molecular subtypes of breast cancer. Further study of BMI-1 expression in luminal subtypes of breast cancer in conjunction with other molecular and biological characteristics will help to understand the mechanisms of aromatase inhibitor therapy failure in postmenopausal luminal breast cancer patients and personalize the prognosis for this group of patients.

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

чено, что прогрессирование болезни на фоне терапии ингибиторами ароматазы связано со стимуляцией механизмов гормональной резистентности опухоли, за счет активации белками ROR1 и BMI-1 Wnt-сигнального пути и, возможно, транскрипционной репрессии CDKN2D [1, 3, 18].

Степень гистологической злокачественности карцином молочной железы является интегральным морфологическим признаком, отражающим на светооптическом уровне степень морфологической и структурной анаплазии опухоли. Обнаруженная нами связь экспрессии белка ROR1 с нарастанием степени злокачественности карциномы согласуется с результатами других исследований [9].

Дальнейшие исследования оправданы для полного выяснения оси сигнализации BMI-1/ROR1 и ее потенциала в качестве терапевтической мишени при люминальном раке молочной железы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование отчетливо демонстрирует взаимосвязь протеинов ROR1 и BMI-1 с клинико-патологическими параметрами первичной опухоли и течением болезни при люминальных молекулярных подтипах рака молочной железы. Дальнейшее изучение экспрессии BMI-1 при люминальных подтипах РМЖ в совокупности с другими молекулярно-биологическими характеристиками поможет понять механизмы развития неэффективности терапии ингибиторами ароматазы, возникающей у больных люминальным раком молочной железы в постменопаузе, и индивидуализировать прогноз для данной группы пациенток.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu Y., Yang H., Chen T. et al. Silencing of receptor tyrosine kinase ROR1 inhibits tumor-cell proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma // *PloS one*. 2015;10(5):e0127092. DOI: 10.1371/journal.pone.0127092.
2. Chien H.P., Ueng S.H., Chen S.C. et al. Expression of ROR1 has prognostic significance in triple negative breast cancer // *Virchows Archiv*. 2016;468(5):589-595. DOI: 10.1007/s00428-016-1911-3.
3. Zhang S., Cui B., Lai H. et al. Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2014;111(48):17266-17271. DOI: 10.1073/pnas.1419599111.
4. Dave H., Anver M.R., Butcher D.O. et al. Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies // *PloS One*. 2012;7(12):e52655. DOI: 10.1371/journal.pone.0052655.
5. Hamilton G., Rath B., Klameth L., Hochmair M. Receptor tyrosine kinase expression of circulating tumor cells in small cell lung cancer // *Oncoscience*. 2015;2(7):629-634. DOI: 10.18632/oncoscience.179.
6. Karachaliou N., Gimenez-Capitan A., Drozdowskyj A. et al. ROR1 as a novel therapeutic target for EGFR-mutant non-small-cell lung cancer patients with the EGFR T790M mutation // *Transl. Lung Cancer Res*. 2014;3(3):122-130. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.03.02.
7. Hudecek M., Schmitt T.M., Baskar S. et al. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor // *Blood*. 2010;116(22):4532-4541. DOI: 10.1182/blood-2010-05-283309.
8. Baskar S., Kwong K.Y., Hofer T. et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia // *Clin. Cancer Res*. 2008;14(2):396-404. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1823.
9. Balakrishnan A., Goodpaster T., Randolph-Habecker J. et al. Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues // *Clin. Cancer Res*. 2017;23(12):3061-3071. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2083.
10. Li C., Wang S., Xing Z. et al. A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis // *Nat. Cell Biol*. 2017;19(2):106-119. DOI: 10.1038/ncb3464.
11. Pandey G., Borcherdig N., Kolb R. et al. ROR1 potentiates FGFR signaling in basal-like breast cancer // *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):718. DOI: 10.3390/cancers11050718.
12. Hasan M.K., Widhopf G.F. 2nd, Zhang S. et al. Wnt5a induces ROR1 to recruit cortactin to promote breast-cancer migration and metastasis // *NPJ Breast Cancer*. 2019;5:35. DOI: 10.1038/s41523-019-0131-9.
13. Bhattacharya R., Mustafi S.B., Street M. et al. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology // *Genes Dis*. 2015;2(3):225-239. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.04.001.
14. Liu Y., Liu F., Yu H. et al. Akt phosphorylates the transcriptional repressor Bmi1 to block its effects on the

## REFERENCES

1. Liu Y., Yang H., Chen T. et al. Silencing of receptor tyrosine kinase ROR1 inhibits tumor-cell proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma. *PloS one*. 2015;10(5):e0127092. DOI: 10.1371/journal.pone.0127092.
2. Chien H.P., Ueng S.H., Chen S.C. et al. Expression of ROR1 has prognostic significance in triple negative breast cancer. *Virchows Archiv*. 2016;468(5):589-595. DOI: 10.1007/s00428-016-1911-3.
3. Zhang S., Cui B., Lai H. et al. Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2014;111(48):17266-17271. DOI: 10.1073/pnas.1419599111.
4. Dave H., Anver M.R., Butcher D.O. et al. Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies. *PloS One*. 2012;7(12):e52655. DOI: 10.1371/journal.pone.0052655.
5. Hamilton G., Rath B., Klameth L., Hochmair M. Receptor tyrosine kinase expression of circulating tumor cells in small cell lung cancer. *Oncoscience*. 2015;2(7):629-634. DOI: 10.18632/oncoscience.179.
6. Karachaliou N., Gimenez-Capitan A., Drozdowskyj A. et al. ROR1 as a novel therapeutic target for EGFR-mutant non-small-cell lung cancer patients with the EGFR T790M mutation. *Transl. Lung Cancer Res*. 2014;3(3):122-130. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.03.02.
7. Hudecek M., Schmitt T.M., Baskar S. et al. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010;116(22):4532-4541. DOI: 10.1182/blood-2010-05-283309.
8. Baskar S., Kwong K.Y., Hofer T. et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res*. 2008;14(2):396-404. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1823.
9. Balakrishnan A., Goodpaster T., Randolph-Habecker J. et al. Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues. *Clin. Cancer Res*. 2017;23(12):3061-3071. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2083.
10. Li C., Wang S., Xing Z. et al. A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nat. Cell Biol*. 2017;19(2):106-119. DOI: 10.1038/ncb3464.
11. Pandey G., Borcherdig N., Kolb R. et al. ROR1 potentiates FGFR signaling in basal-like breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):718. DOI: 10.3390/cancers11050718.
12. Hasan M.K., Widhopf G.F. 2nd, Zhang S. et al. Wnt5a induces ROR1 to recruit cortactin to promote breast-cancer migration and metastasis. *NPJ Breast Cancer*. 2019;5:35. DOI: 10.1038/s41523-019-0131-9.
13. Bhattacharya R., Mustafi S.B., Street M. et al. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. *Genes Dis*. 2015;2(3):225-239. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.04.001.
14. Liu Y., Liu F., Yu H. et al. Akt phosphorylates the transcriptional repressor Bmi1 to block its effects on the

- tumor-suppressing *INK4a-ARF* locus // *Sci Signal*. 2012;5(247):ra77. DOI: 10.1126/scisignal.2003199.
15. Guo B.H., Feng Y., Zhang R. et al. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer // *Mol. Cancer*. 2011;10(1):10. DOI: 10.1186/1476-4598-10-10.
  16. Liu J.Y., Jiang Y.N., Huang H. et al. BMI-1 promotes breast cancer proliferation and metastasis through different mechanisms in different subtypes // *Cancer Sci*. 2023;114(2):449-462. DOI: 10.1111/cas.15623.
  17. Kim W.Y., Sharpless N.E. The regulation of *INK4/ARF* in cancer and aging // *Cell*. 2006;127(2):265-275. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.003.
  18. Wang Y., Jin W., Jia X. et al. Transcriptional repression of CDKN2D by PML/RAR $\alpha$  contributes to the altered proliferation and differentiation block of acute promyelocytic leukemia cells // *Cell Death Dis*. 2014;5(10):e1431. DOI: 10.1038/cddis.2014.388.
  19. Garcia-Recio S., Thennavan A., East M.P. et al. FGFR4 regulates tumor subtype differentiation in luminal breast cancer and metastatic disease // *J. Clin. Invest*. 2020;130(9):4871-4887. DOI: 10.1172/JCI130323.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Тараканова Валерия Олеговна** – младший научный сотрудник НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; ассистент кафедры онкологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. SPIN-код: 9986-7494. Scopus Author ID: 869234. ORCID: 0000-0001-9472-017X.

**Крахмаль Надежда Валерьевна** – канд. мед. наук, доцент, старший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. SPIN-код: 1543-6546. Researcher ID: S-3799-2016. Scopus Author ID: 56678622400. ORCID: 0000-0002-1909-1681.

**Бабышкина Наталия Николаевна** – д-р мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. SPIN-код: 2738-9275. Scopus Author ID: 26641099700. Researcher ID: A-7526-2012. ORCID: 0000-0002-0562-3878.

**Вторушин Сергей Владимирович** – д-р мед. наук, руководитель отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. SPIN-код: 2442-4720. Researcher ID: S-3789-2016. Scopus Author ID: 26654562300. ORCID: 0000-0002-1195-4008.

the tumor-suppressing *INK4a-ARF* locus. *Sci Signal*. 2012;5(247):ra77. DOI: 10.1126/scisignal.2003199.

15. Guo B.H., Feng Y., Zhang R. et al. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Mol. Cancer*. 2011;10(1):10. DOI: 10.1186/1476-4598-10-10.
16. Liu J.Y., Jiang Y.N., Huang H. et al. BMI-1 promotes breast cancer proliferation and metastasis through different mechanisms in different subtypes. *Cancer Sci*. 2023;114(2):449-462. DOI: 10.1111/cas.15623.
17. Kim W.Y., Sharpless N.E. The regulation of *INK4/ARF* in cancer and aging. *Cell*. 2006;127(2):265-275. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.003.
18. Wang Y., Jin W., Jia X. et al. Transcriptional repression of CDKN2D by PML/RAR $\alpha$  contributes to the altered proliferation and differentiation block of acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Death Dis*. 2014;5(10):e1431. DOI: 10.1038/cddis.2014.388.
19. Garcia-Recio S., Thennavan A., East M.P. et al. FGFR4 regulates tumor subtype differentiation in luminal breast cancer and metastatic disease. *J. Clin. Invest*. 2020;130(9):4871-4887. DOI: 10.1172/JCI130323.

## ABOUT THE AUTHORS

**Valeriia O. Tarakanova** – Junior Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Assistant, Department of Oncology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. SPIN-code: 9986-7494. Scopus Author ID: 869234. ORCID: 0000-0001-9472-017X.

**Nadezhda V. Krakhmal'** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Senior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. SPIN-code: 1543-6546. Researcher ID: S-3799-2016. Scopus Author ID: 56678622400. ORCID: 0000-0002-1909-1681.

**Nataliya N. Babyskhina** – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology with a course of Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. SPIN-code: 2738-9275. Scopus Author ID: 26641099700. Researcher ID: A-7526-2012. ORCID: 0000-0002-0562-3878.

**Sergey V. Vtorushin** – Dr. Sci. (Med.), Head, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. SPIN-code: 2442-4720. Researcher ID: S-3789-2016. Scopus Author ID: 26654562300. ORCID: 0000-0002-1195-4008.