

УДК 575:599.9

**АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ *RHOA* И *NKIRAS1*
В ОПУХОЛЯХ ЛЕГКОГО АССОЦИИРОВАНА
С ПОТЕРЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЭТИХ
ГЕНОВ И С МЕТИЛИРОВАНИЕМ ГЕНОВ
РЕГУЛЯТОРНЫХ микроРНК***

© 2015 Э.А. Брага^{1,2**}, В.И. Логинов^{1,2}, И.В. Пронина^{1,2},
Д.С. Ходырев³, С.В. Рыков⁴, А.М. Бурденный¹,
М.В. Фридман⁵, Т.П. Казубская⁶, А.А. Кубатиев¹,
Н.Е. Кушлинский⁶

¹ Научно-исследовательский институт общей патологии
и патофизиологии, 125315 Москва; факс: +7(495)601-2366,
электронная почта: leonora10_45@mail.ru

² Медико-генетический научный центр РАМН, 115478 Москва;
факс: +7(499)324-0702, электронная почта: karpukhin@med-gen.ru

³ Федеральный научно-клинический центр специализированных
видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России,
115682 Москва; факс: +7(495)395-6430, электронная почта: DmKh8@mail.ru

⁴ Государственный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, 117545 Москва;
факс: +7(495)315-0501, электронная почта: genetika@genetika.ru

⁵ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 117971 Москва;
факс: +7(499)135-6213, электронная почта: iogen@vigg.ru

⁶ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина,
Москва, 115478; факс: +7(499)324-6352,
электронная почта: biochimia@mtu-net.ru

Поступила в редакцию 30.11.14
После доработки 19.01.14

Метилирование CpG-островков промоторных районов и взаимодействие микроРНК с матричными РНК генов-мишеней относятся к совокупности многоуровневых механизмов регуляции экспрессии генов. Цель настоящей работы – оценить возможность опосредованного влияния метилирования генов микроРНК на активацию их генов-мишеней в опухолях легкого. С использованием единой коллекции образцов немелкоклеточного рака легкого показано, что повышение уровня мРНК генов *RHOA* и *NKIRAS1* статистически значимо ($P < 10^{-11}$, по Спирману) ассоциировано как с потерей метилирования их CpG-островков, так и с метилированием ряда генов микроРНК, предсказанных как регуляторные по данным miRWalk. Определены новые потенциальные регуляторные микроРНК для *RHOA* (miR-9-1/-3, -34b/c, -129-2, -125b-1, -375, -1258) и *NKIRAS1* (miR-34b/c, -129-2, -125b-1, -193a, -124a-1/-2/-3, -212, -132) при раке легкого.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CpG-островки, метилирование, микроРНК, гены-мишени, *RHOA*, *NKIRAS1*, мРНК, рак легкого.

Рак легкого стоит на первом месте по частоте заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей. Ежегодно в мире заболевает около 1,3 млн и умирает 1,2 млн человек. В Рос-

сии от рака легкого ежегодно умирают более 40 000 человек [1]. Пятилетняя выживаемость при обнаружении рака легкого на первой-второй стадии составляет 57–67%, на третьей – 5–25%

Принятые сокращения: мРНК – микроРНК; МС-ПЦР – метилспецифичная ПЦР; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; МЧРА – метил-чувствительный рестриктазный анализ; ОТ-ПЦР – (здесь) ПЦР на кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции РНК.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM14-325, 22.02.2015.

** Адресат для корреспонденции.

и четвертой – менее 1%. Причем, к наиболее распространенному виду рака легкого (более 90%) относится немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Эти данные показывают актуальность изучения механизмов регуляции генов в патогенезе НМРЛ, что важно для выявления новых молекулярных маркеров и мишеней таргетной терапии столь социально значимого заболевания.

Регуляция экспрессии генов осуществляется на различных уровнях и ее механизмы разнообразны [2, 3]. Эпигенетические механизмы в комплексе с генетическими (мутациями генов и хромосомными aberrациями) ответственны за регуляцию активности генов и сигнальных путей клетки. К совокупности эпигенетических механизмов относятся метилирование промоторных CpG-островков генов, кодирующих белки, и воздействие регуляторных миРНК, связывающихся с 3'-нетранслируемым участком матричной РНК гена-мишени. Метилирование промоторных CpG-островков может вызывать инактивацию гена на геномном уровне, а взаимодействие регуляторных миРНК с мРНК осуществляется на посттранскрипционном уровне и приводит к разрушению мРНК и нарушению трансляции. Этот путь инактивации белок-кодирующего гена находится в зависимости от содержания данной миРНК, синтез которой может быть подавлен с помощью ряда механизмов, включая метилирование промоторного CpG-островка гена данной миРНК. За последнее десятилетие резко возрос интерес к определению мишеней метилирования, метилом и мишеней миРНК в опухолях разных локализаций [4–7].

Важное свойство миРНК – ее широкая мультитаргетность. Каждая миРНК может участвовать в регуляции сотни белок-кодирующих генов, и наоборот, структурный ген обычно представляет мишень для набора миРНК (например, miRWalk [8]). Согласно данным биоинформатики, миРНК потенциально вовлечены в регуляцию более половины белок-кодирующих генов. В опухолях миРНК может выполнять и онкогенные функции (*miR-21*), подавляя гены-супрессоры опухолевого роста, и супрессорные функции (*miR-34*), подавляя онкогены и гены прогрессии опухолей [7]. Противоопухолевые супрессорные миРНК могут инактивироваться метилированием во многих видах рака, что способствует активации онкогенов, относящихся к их мишеням. Данная работа нацелена расширить круг супрессорных миРНК и их генов-мишеней. В качестве таких мишеней были исследованы два гена короткого плеча хромосомы 3 человека (3p) *RHOA* (3p21.31) и *NKIRAS1* (3p24.2) при НМРЛ.

Известно, что среди прочих геномных районов 3p-плечо представляет область экстремально частых делеций в эпителиальных опухолях легкого, почки и других тканей. С участием авторов идентифицированы критичные районы 3p, содержащие множество генов-супрессоров опухолевого роста; к наиболее изученным онкосупрессорам 3p относятся *RASSF1A*, *RARB2*, *SEMA3B*, *CTDSPL* и др. [9, 10]

Однако в опухолях на 3p детектированы не только делеции, но и амплификации, и, соответственно, гены, проявляющие повышенную экспрессию и онкогенную активность. Например, в районе MECA3 (Major Epithelial CAncer region 3, 3p21.31) потеря одного аллеля наблюдается часто в комбинации с амплификацией второго аллеля [11–13]. И действительно, в этом районе идентифицировано несколько генов, проявляющих функции онкогенов, например, протоонкогены *MST1R/RON* и *RHOA*. Так, из двух альтернативных транскриптов *MST1R/RON* (функционального и онкогенного) в опухолевых клетках активизируется онкогенный транскрипт [14].

Онкогенный потенциал и повышенная экспрессия *RHOA* отмечена в эпителиальных опухолях разных локализаций, причем как на уровне белкового продукта, так и мРНК [15–17]. Показано, что мутации в гене *RHOA* в эпителиальных опухолях не обнаруживаются и, следовательно, существуют некие другие факторы, повышающие его экспрессию в онкогенезе. Для гена *NKIRAS1* (из района 3p24.2) (гомолога онкогена *ras*), продукт которого регулирует активность транскрипционного фактора NF-κappaB [18, 19], нами получены первые данные о повышенной транскрипционной активности в опухолях молочной железы и легкого, которые также позволяют предполагать онкогенную функцию *NKIRAS1* в этих видах рака [20, 21].

В представленной работе исследована роль метилирования в регуляции экспрессии протоонкогенов *RHOA* (3p21.31) и *NKIRAS1* (3p24.2) при НМРЛ, а именно метилирования CpG-островков их собственных промоторных районов и CpG-островков ряда генов миРНК, предсказанных как регуляторные (по данным miRWalk [8]).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор генов миРНК, перекрывающихся с CpG-островками и связанных с развитием опухолей, а также предсказанных как регуляторные для генов *RHOA* (3p21.31) и *NKIRAS1* (3p24.2), проводили с привлечением базы данных miRWalk [8].

Образцы опухолей и гистологически неизменной ткани легкого собраны и клинически оха-

рактеризованы в ФГБНУ РОНЦ от 35 больных, находившихся там на обследовании и лечении. В исследование включены больные НМРЛ, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [22, 23]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (толщина 3–5 мкм), окрашенных эозином и гематоксилином. Отбирали образцы с содержанием опухолевых клеток не менее 70%. Образцы тканей хранили при -70° .

Высокомолекулярную ДНК выделяли из образцов опухоли и неизменной ткани легкого по стандартной методике, включающей обработку клеток протеиназой К при 37° в течение ночи, последующую экстракцию смесью фенола и хлороформа и осаждение этанолом. ДНК хранили при -20° . Качество и концентрацию ДНК проверяли с помощью электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле с использованием ДНК фага- λ («Fermentas», «Thermo Fisher Scientific», США) в качестве эталона сравнения.

Суммарную РНК выделяли из образцов опухоли и гистологически неизменной ткани с помощью экстракции смесью гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформ [24]. Образцы РНК перед применением в исследованиях проходили обработку ДНКазой, свободной от РНКазы. Водный раствор РНК хранили при температуре -40° .

кДНК синтезировали на матрице суммарной РНК с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони (M-MuLV Reverse Transcriptase, «Fermentas», «Thermo Fisher Scientific», США) и вырожденных гептамеров (random heptamers) в качестве праймеров по протоколу, предлагаемому фирмой.

Содержание мРНК RHOA и NKIRAS1 определяли методом полуколичественной ОТ-ПЦР в парных образцах от 35 больных НМРЛ. Праймеры, температура отжига ($T_{отж}$) и размеры продуктов ПЦР приведены в таблице. ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 16,7 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01%-ный Tween-20, по 0,2 мМ каждого dNTP, по 0,2 мкМ каждого праймера, 2 мкл кДНК и 1 ед рекомбинантной термостабильной Taq ДНК-полимеразы («Fermentas», «Thermo Fisher Scientific», США). Реакцию амплификации проводили по программе: 95° , 5 мин; 35 циклов (94° , 15 с, $T_{отж}$ (таблица) 25 с, 72° , 45 с), 72° , 2 мин на амплификаторе DNA Engine Dyad Cycler («Bio-Rad»,

США). Продукты амплификации анализировали в 2%-ном агарозном геле с 0,5 мкг/мл бромида этидия. Гель фотографировали в проходящем УФ свете с помощью системы гель-документирования Gel Imager-2 («Хеликон», Россия) и данные анализировали с помощью программы Gel-Analysis. Учитывали случаи с изменением содержания мРНК в образцах опухолей по сравнению с образцами неизменной ткани в пять и более раз.

Анализ метилирования промоторных районов генов RHOA и NKIRAS1 проводили с применением двух метилчувствительных рестриктаз HpaII (CCGG) и HhaI (GCGC) («Fermentas», «Thermo Fisher Scientific», США) в условиях, приведенных в протоколах фирмы и последующей ПЦР как описано ранее [21]. Праймеры, температура отжига ($T_{отж}$) и размеры продуктов ПЦР приведены в таблице. Буфер содержал 60 мМ Tris-HCl, pH 8,5, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ KCl, 0,1%-ный Triton X-100. Для амплификации использовали рекомбинантную термостабильную Taq-ДНК полимеразу («Fermentas», «Thermo Fisher Scientific», США), dATP, dCTP, dGTP, dTTP («СибЭнзим», Россия). Полноту гидролиза оценивали, используя ПЦР-фрагмент гена β -3A-адаптина (K1, 445 п.н., ID Gen-Bank AF247736.2, таблица), который содержит участки узнавания используемых рестриктаз с неметилированными CpG-динуклеотидами (в норме и опухоли). Сохранность ДНК до и после гидролиза оценивали с использованием фрагмента гена RARB2, не содержащего участков узнавания данных рестриктаз (K2, 229 п.н., таблица). Амплификацию фрагментов исследованных локусов проводили по программе: 95° , 2 мин; 35 циклов (92° , 10 с, $T_{отж}$ (таблица), 25 с, 72° , 25 с), 72° , 3 мин; на приборе DNA Engine Dyad Cycler («Bio-Rad», США). Продукты ПЦР исследуемых и контрольных фрагментов генов разделяли одновременно электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР) применяли для анализа метилирования 13 генов мРНК в парных образцах больных НМРЛ как описано ранее [20]. ДНК после обработки бисульфитом очищали, используя колонки Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 («Millipore», США). Метилирование каждого гена мРНК анализировали с использованием двух пар праймеров, специфичных как к метилированному, так и к неметилированному аллелю (таблица). Праймеры, температура отжига ($T_{отж}$) и размеры продуктов ПЦР для 13 генов мРНК приведены в таблице. Амплификацию проводили по программе: 94° , 3 мин; 35 циклов (94° , 10 с; $T_{отж}$ (таблица), 20 с; 72° , 30 с);

Праймеры, температура отжига ($T_{отж}$) и размеры продуктов ПЦР

Метод	Маркер	Структура праймеров	$T_{отж}$	Продукт ПЦР, п.н.
1	2	3	4	5
АД	D3S2409	F: GGTGACAGAGACTCTTGTCTCA R: CATCTGGTTGGGGAACATA	58°	115–127
	D3S3598	F: TCCACCCAGTAGTGAGCAT R: CGAACTCCTGAACTTGTGA	58°	173–179
ОТ-ПЦР	<i>RHOA</i>	F: CTGGTGATTGTTGGTGATGG R: GCGATCATAATCTTCCTGCC	58°	183
	<i>NKIRAS1</i>	F: ATTTGCTGATGGCTTCGTTCTTGT R: ACTTTCTCACTTTTGGCCACTGC	54°	201
	<i>B2M</i>	F: TGACTTTGTACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	64°	80
МЧРА	K1	F: TGCCCTCTGGACTGGAACCT R: CCTGAGCCCAGCCCAAGTC	64°	445
	K2	F: AGAGTTTGATGGAGTTGGGT R: CATTCGGTTTGGGTCAATCC	62°	229
	<i>RHOA</i>	F: GAGCCCGTCCACGCCCTAAAAGCAAAC R: CGCCTCCCACTCCCGCAAGAAGCTCG	64,9°	416
	<i>NKIRAS1</i>	F: CGCCCGCAATCCACCCACTCC R: CGCCGCGGCCGCTATTGTCC	67,0°	523
МС-ПЦР	<i>miR-34b/c</i>	MF: TTTAGTTACGCGTGTGTGTC MR: ACTACAACCTCCCGAACGATC	57°	189
		UF: TGGTTTAGTTATGTGTGTTGTGT UR: CAACTACAACCTCCCAAACAATCC	57°	190
	<i>miR-212</i>	MF: GAAGGTGTTGGCGTTTTAGGAGAC MR: AACGCCCGACGCCATACGAA	52°	168
		UF: TTAGGAAAGTGAGGTGAAGG UR: AAAAAAATAAAACATCCAT	51°	141
	<i>miR-124a-1</i>	MF: AGAGTTTTTGGAAAGCGTCG MR: AAAAAAATAAAAAACGACGC	56,2°	155
		UF: AATAAAGAGTTTTTGGAAAGATGTT UR: CAAAAAAAAAAAAATAAAAAACAACAC	56,2°	166
	<i>miR-124a-3</i>	MF: GATAGTATAGTCGGTTGAGCGTAGC MR: CCTCAAAACTAAAACGAACGACG	52°	152
		UF: TAGTTGGTTGAGTGTAGTGTTTTTG UR: CAAAACATAAACAAACAACAACATC	52°	142
	<i>miR-124a-2</i>	MF: GGTTTATGTATGTTTTTAGGCG MR: TCCGTAAAAATATAAACGATAG	49,1°	93
		UF: TAGGTTTATGTATGTTTTTAGGTG UR: CTATTCATAAAAAATAAAACAATACA	49,1°	99
	<i>miR-132</i>	MF: GCGTCGGCGTCGTTTCG MR: CGCCCCCGCCTCCTTCTA	58°	168
		UF: GTGTGTGTGTTGTTTG UR: ACCCCCACCTCCTTCTAC	58°	141

1	2	3	4	5
МС-ПЦР	<i>miR-129-2</i>	MF: GATTTTAGTTTCGTATTAATGAGTTGGCGGTTTC MR: AACCCCGACTACAAAATCGCG	54°	210
		UF: TGATTTTAGTTTGTATTAATGAGTTGGTGGTTTTG UR: ACCAACCCCAACTACAAAATCACA	54°	210
	<i>miR-9-1</i>	MF: TTTTATTTTCGTTGACGGGC MR: CCCGCCTCCTAACTACTATCG	52°	120
		UF: TTTTATTTTATTTTGTGATGGGT UR: CCCACCTCCTAACTACTATCACC	55°	120
	<i>miR-9-3</i>	MF: GGTGTTAGGACGTACGGAAC MR: TACCCGAATCCTAAAACGC	54°	180
		UF: GGTGTTAGGATGTATGGAAT UR: TACCCAAATCCTAAAACAC	54°	170
	<i>miR-193a</i>	MF: GAGGTATTTGGTTCGGAGCGTAC MR: GACCCCGAAACCAACG	56°	86
		UF: ATTGATTTATAATTTTGTGAGAGTGTG UR: TCCCAAATAACATACACTCCA	50°	153
	<i>mir-125b-1</i>	MF: TGGTGATCGTTTTTTGTGTTTC MR: ACCCATTTCGAAACGAAAC	53°	190
		UF: ATTTGGTGTATGTTTTTTGTGTTTT UR: CTCACCCATTCAAAAACAAAAC	53°	190
	<i>miR-375</i>	MF: TCGTTATCGTTATTTAATCGTACG MR: AAAAATTTCTATTCTAAACCACGAC	53°	200
		UF: TGTTATTGTTATTTAATTGTATGG UR: AAAAATTTCTATTCTAAACCACAAC	53°	199
<i>miR-1258</i>	MF: AGGTCGTGGAAGTTATAGGC MR: CGAACCTACACCTAAACGC	57°	126	
	UF: ATTAGGTTGTGGAAGTTATAGGT UR: AACAAACCTACACCTAAACACA	56°	126	

Примечание. Праймеры и условия ПЦР для анализа АД маркеров *D3S2409* и *D3S3598* взяты из базы данных GenBank Amplicon. Праймеры для ОТ-ПЦР *RHOA* и МС-ПЦР *miR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-193a*, *-124a-1/-2/-3*, *-129-2*, *-125b-1* взяты из литературы [25–29]. Праймеры для ОТ-ПЦР *B2M*, *NKIRAS1*; МЧРА *NKIRAS1*, *RHOA*; и МС-ПЦР *miR-212*, *-375*, *-1258* подобраны нами ранее с помощью программы Primer Select из пакета программ Lasergene7 [20, 21, 30–32]. Праймеры для МС-ПЦР *miR-132* подобраны в этой работе. Синтез олигонуклеотидных праймеров выполнен в «Евроген» (Россия).

72°, 3 мин. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad Cycler («Bio-Rad», США). Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК. Продукты ПЦР исследуемых и контрольных фрагментов генов разделяли одновременно с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле.

Анализ аллельных дисбалансов (АД) полиморфных маркеров *D3S2409* и *D3S3598* в ДНК опухолей. Праймеры, условия ПЦР и размеры продук-

тов ПЦР взяты из базы данных GenBank Amplicon (таблица). Буфер содержал 60 мМ Tris-HCl, pH 8,5, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ KCl, 0,1%-ный Triton X-100. ПЦР проводили, как описано ранее [11, 16], на приборе DNA Engine Dyad Cycler («Bio-Rad», США). Разделение продуктов ПЦР проводили в 10%-ном полиакриламидном геле. Гель фотографировали в проходящем УФ-свете с помощью системы гель-документирования Gel Imager-2 («Хеликон», Россия) и анализировали с помощью программы Gel-Analysis.

Статистический анализ ряда данных проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0,05. Конкордантность данных по метилированию и экспрессии для генов *RHOA* и *NKIRAS1*, а также соответствию данных по метилированию ряда генов миРНК изменениям экспрессии генов-мишеней *RHOA* и *NKIRAS1*, оценивали с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмана и *t*-теста Стьюдента:

$$t = Rs/\sqrt{((1 - Rs^2)/(N - 2))},$$

с числом степеней свободы $\nu = N - 2$, где N – размер выборки. Уровень значимости принят равным 10^{-6} .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Локализация на хромосоме 3p и структурно-функциональная организация генов *RHOA* и *NKIRAS1* представлена на рис. 1, из которого видно наличие у обоих генов CpG-островков вблизи старта транскрипции и 3'-нетранслируемых участков, способных к связыванию ряда миРНК, согласно данным miRWalk [8].

Повышенная экспрессия генов *RHOA* и *NKIRAS1* в опухолях больных НМРЛ ассоциирована с деметилированием их промоторных областей и

амплификацией. Анализ уровня экспрессии мРНК генов *RHOA* и *NKIRAS1* в 35 парных образцах НМРЛ показал статистически значимое преобладание образцов с повышенным (в 5 или более раз) уровнем мРНК у этих генов. Так, у гена *NKIRAS1* 5-кратно или более повышенная экспрессия выявлена в 21 из 35 образцов опухолей по сравнению с гистологически неизменной тканью, а сниженная – в 2/35 ($P = 1,6 \times 10^{-6}$ по Фишеру). У гена *RHOA* это различие еще более значимо (24/35 против 2/35, $P = 4,56 \times 10^{-8}$ по Фишеру). Преобладание повышенной экспрессии у этих генов в опухолях больных НМРЛ свидетельствует об онкогенных функциях *RHOA* и *NKIRAS1* в этом виде рака.

Чтобы оценить вклад генетических и эпигенетических факторов в изменение экспрессии этих генов при НМРЛ, исследовано метилирование промоторных CpG-островков *RHOA* и *NKIRAS1* и изменение аллельных дисбалансов в маркерах D3S2409 (интрон 2 гена *RHOA*) и D3S3598 (отстоит на 92 т.п.н. от гена *NKIRAS1*). На рис. 2, а приведены типичные примеры паттернов метилирования этих генов в трех парных образцах НМРЛ на электрофореграммах, и наглядно видно интенсивное метилирование в образцах гистологически неизменной ткани и его отсутствие в образцах опухолей.

На рис. 2, б для 35 больных НМРЛ суммированы данные по изменению уровня мРНК в

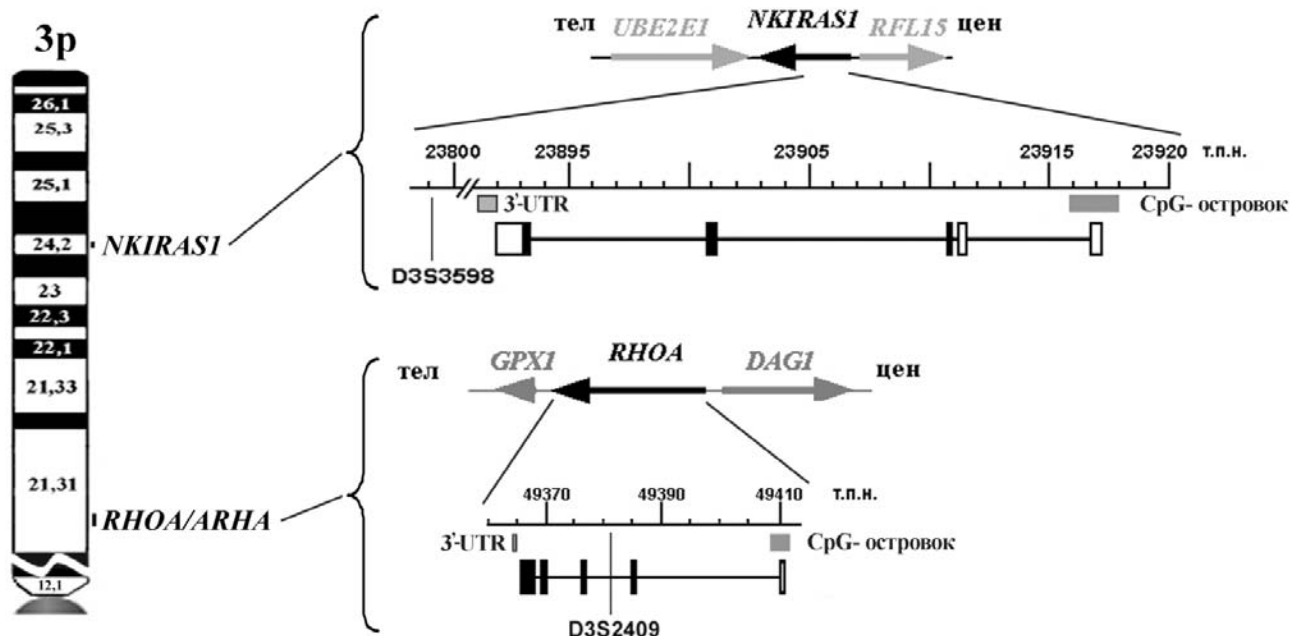


Рис. 1. Геномная организации генов 3p *RHOA* и *NKIRAS1*. Даны экзон-интронная структура, направление транскрипции, положение CpG-островков и 3'-нетранслируемых регионов (3'-UTR), участвующих в связывании регуляторных миРНК (база данных NCBI, Release 106)

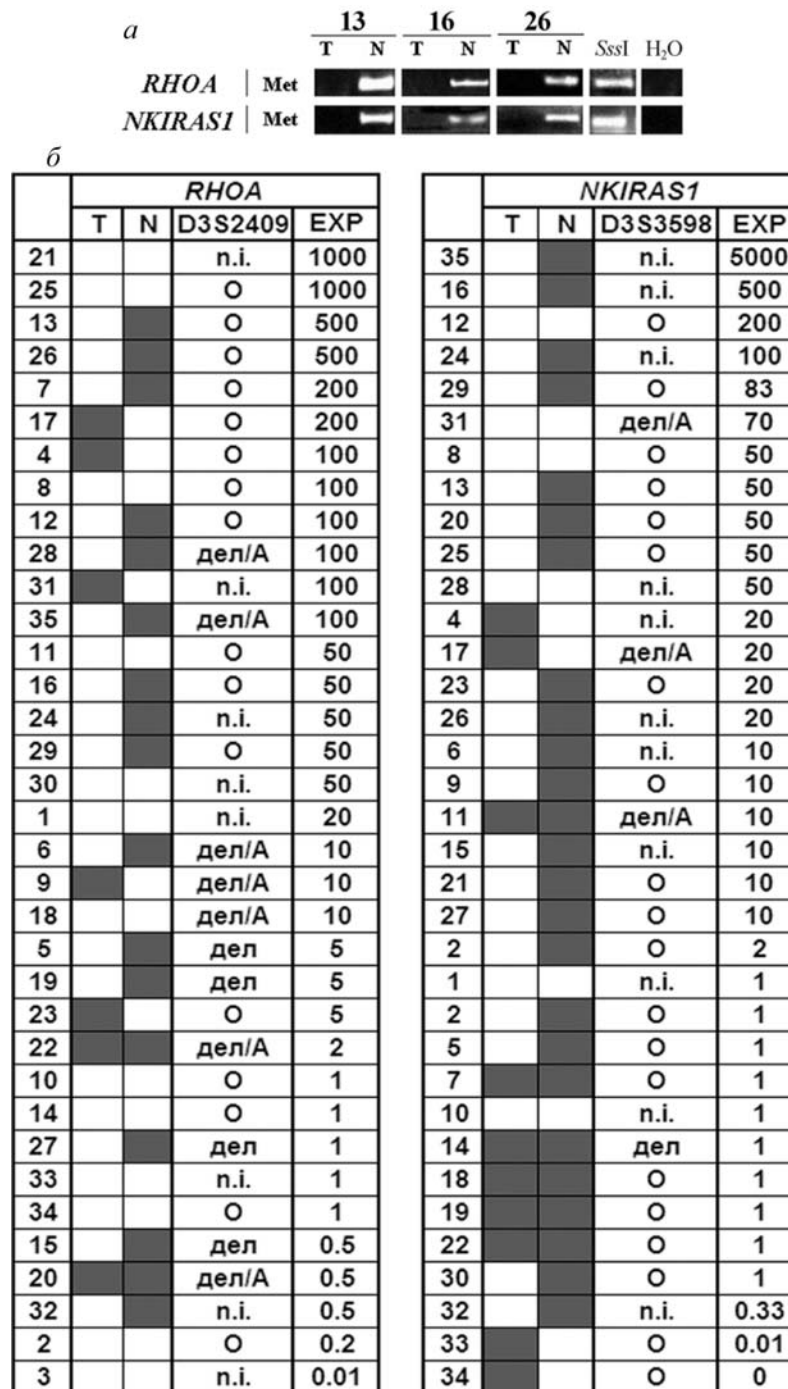


Рис. 2. *a* – Репрезентативные примеры амплификации продуктов МЧРА генов *RHOA*, *NKIRAS1* в трех парных образцах НМРЛ (13, 16, 26); опухоль – Т, условная норма – N; H₂O – ПЦР в отсутствие ДНК; SssI – образец ДНК клеточной линии фибробластов человека L-68, обработанный метилтрансферазой SssI («СибЭнзим», Россия). Продукты МЧРА разделяли в 3%-ном агарозном геле. Условия ПЦР и размеры амплифицированных фрагментов приведены в таблице; *b* – сопоставление изменений экспрессии генов *RHOA* и *NKIRAS1* в опухолях больных НМРЛ со структурными изменениями (метилированием/деметилованием и амплификациями/делециями) в генах. Данные приведены в соответствии с понижением уровня мРНК гена (EXP, справа) в опухоли (Т) по сравнению с гистологически неизменной тканью легкого (N). Слева даны результаты по определению статуса метилирования гена методом МЧРА в образцах НМРЛ (Т/Н); по центру приведены данные по анализу аллельных дисбалансов (АД) маркеров D3S2409 и D3S3598 (рис. 1). Черные квадратики – метилирование выявлено, белые – не выявлено; А – амплификация, дел – делеция, дел/А – делеция одного аллеля с амплификацией второго аллеля, кружок – сохранение гетерозиготности, n.i. – неинформативный случай. Значения интенсивностей полос продуктов ОТ-ПЦР генов *RHOA* и *NKIRAS1* нормировали относительно интенсивностей полос продукта ОТ-ПЦР контрольного гена *B2M*. Условия ПЦР и размеры амплифицированных фрагментов приведены в таблице

опухолях, по наличию метилирования в ДНК опухолей и парной гистологически неизменной ткани и по аллельным изменениям в прилежащих полиморфных локусах. Видно, что повышение экспрессии в опухолях, как правило, ассоциировано с деметилированием промоторного района гена. Так, у гена *RHOA* из 24 образцов НМРЛ с повышением уровня мРНК (в 5 или более раз) в опухолях – в 12 образцах (50%) метилирование выявлено только в гистологически неизменной ткани при отсутствии в парном образце опухоли. У гена *NKIRAS1* деметилирование в опухолях детектировано в 15 из 21 образца с повышенной экспрессией (71%). В 2 случаях (№ 33, 34) падение экспрессии *NKIRAS1* ассоциировано с метилированием гена в ДНК опухоли.

Амплификации или делеции локусов (по данным для маркеров D3S2409 и D3S3598), перекрывающих *RHOA* или *NKIRAS1*, могут вносить дополнительный вклад в изменение уровня экспрессии этих генов. Так, например, амплификация второго аллеля может вносить вклад в повышенную экспрессию *RHOA* в образце № 18 и *NKIRAS1* в образце № 31 (рис. 2, б). Есть примеры, когда оба этих фактора – и деметилирование, и амплификация ассоциированы с повышенным уровнем гена *RHOA* (образцы № 28, 35, 6). При помощи непараметрической статистики по методу Спирмана выявлена значимая корреляция между изменениями уровня мРНК и генетическими и эпигенетическими изменениями в генах. Так, для *RHOA*: $R_s = 0,8629$, $t = 9,8079$, $p = 2,63 \times 10^{-11}$; для *NKIRAS1*: $R_s = 0,9103$, $t = 12,6322$, $p = 3,45 \times 10^{-14}$.

Однако, на рис. 2, б можно видеть множество примеров, когда изменения на геномном уровне не могут объяснить активацию данных генов при НМРЛ. Так, 20-, 50- и 1000-кратное повышение уровня мРНК гена *RHOA* (образцы № 1, 30, 11, 8, 25 и 21), как и 50- и 200-кратное повышение уровня мРНК гена *NKIRAS1* (образцы № 28, 8, 12) не связаны ни с деметилированием, ни с амплификацией этих генов.

Метилирование ряда генов миРНК вовлечено в активацию экспрессии генов *RHOA* и *NKIRAS1* в опухолях больных НМРЛ. Другой путь регуляции генов с онкогенной функцией может быть связан с воздействием супрессорных миРНК. Но в опухолях синтез генов миРНК может быть подавлен с помощью того же механизма – метилирования промоторного CpG-островка, что лишает данную миРНК возможности участвовать в подавлении гена-мишени.

Нами изучено метилирование промоторных районов 13 генов миРНК, предсказанных как регуляторные для генов *RHOA* и/или *NKIRAS1*

(согласно miRWalk [8]). В качестве примера (рис. 3) приведен паттерн продуктов МС-ПЦР трех миРНК (*miR-34*, *-129*, *-125b*), которые могут связываться с 3'-нетранслируемой областью матричной РНК обоих генов – *RHOA* и *NKIRAS1*. Для генов *miR-34b/c* и *miR-129-2* продукты ПЦР с праймерами к метилированному аллелю наблюдали во всех трех исследованных образцах опухолей в отличие от условной нормы. Для гена *miR-125b* полное отличие опухоли и условно-нормальной ткани легко видеть в образце № 13, но в образцах № 16 и 26 продукты ПЦР с праймерами к метилированному аллелю наблюдали как в образце опухоли, так и в гистологически неизменной ткани. Однако в образце № 16 интенсивность свечения продукта, специфичного метилированному аллелю, в несколько раз ярче в опухоли, чем в прилежащей гистологически неизменной ткани.

На рис. 4 и 5 сопоставлены наши результаты по изменению уровня мРНК генов *RHOA* и *NKIRAS1* с результатами анализа метилирования группы генов миРНК, предсказанных как регуляторные [8]. Установлена статистически значимая корреляция между изменением уровня мРНК *RHOA* и метилированием 7 генов: *miR-9-1/-3*, *-34b/c*, *-129-2*, *-125b-1*, *-375b*, *-1258* ($P = 10^{-13}$ – 10^{-18} по Спирману, рис. 4). Изменение уровня мРНК *NKIRAS1* связано с метилированием 9 генов: *miR-132*, *-212*, *-193a*, *124a-1/-2/-3*, *34b/c*, *129-2*, *125b-1* ($P = 10^{-11}$ – 10^{-17} по Спирману, рис. 5).

Эти результаты позволяют предположить, что метилирование данных генов миРНК подав-

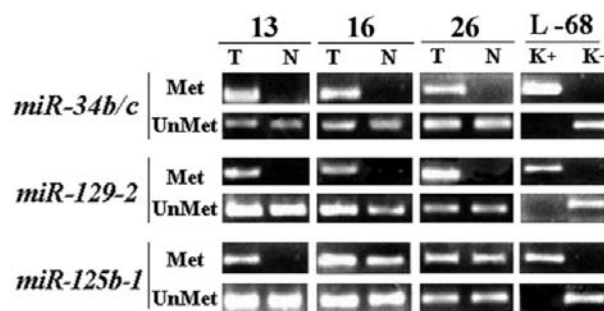


Рис. 3. Репрезентативные примеры амплификации продуктов МС-ПЦР генов *miR-34b/c*, *miR-129-2*, *miR-125b-1* в тех же трех парных образцах НМРЛ (13, 16, 26); опухоль – Т, условная норма – N. Показаны продукты МС-ПЦР с праймерами к метилированным (Met) и неметилированным (UnMet) аллелям. L-68/K⁺ – образец ДНК клеточной линии фибробластов человека L-68; L-68/K⁻ – образец ДНК клеточной линии фибробластов человека L-68, обработанный метилтрансферазой SssI («СибЭнзим», Россия). Продукты МС-ПЦР разделяли в 3%-ном агарозном геле. Условия ПЦР и размеры амплифицированных фрагментов приведены в таблице

№	RHOA	9-1		9-3		34b/c		129-2		125b1		375		1258	
		T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N
21	1000														
25	1000														
13	500														
26	500														
7	200														
17	200														
4	100														
8	100														
12	100														
28	100														
31	100														
35	100														
11	50														
16	50														
24	50														
29	50														
30	50														
1	20														
6	10														
9	10														
18	10														
5	5														
19	5														
23	5														
22	2														
10	1														
14	1														
27	1														
33	1														
34	1														
15	0.5														
20	0.5														
32	0.5														
2	0.2														
3	0.01														
		$R_s=0.9314$ $t=14.7043$ $P=4.79 \times 10^{-16}$		$R_s=0.9465$ $t=16.8487$ $P=8.97 \times 10^{-18}$		$R_s=0.9381$ $t=15.5580$ $P=9.35 \times 10^{-17}$		$R_s=0.9403$ $t=15.8660$ $P=5.27 \times 10^{-17}$		$R_s=0.9110$ $t=12.6892$ $P=3.04 \times 10^{-14}$		$R_s=0.9013$ $t=11.9542$ $P=1.55 \times 10^{-13}$		$R_s=0.9113$ $t=12.7122$ $P=2.90 \times 10^{-14}$	

Рис. 4. Сопоставление данных по снижению (сверху вниз) уровня мРНК *RHOA* в опухолях больных НМРЛ с данными по изменению метилирования генов миРНК (*miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*, *miR-129-2*, *miR-125b-1*, *miR-375*, *miR-1258*) в образцах опухолей (Т) и гистологически неизменной ткани (N) легкого. Черный прямоугольник – метилирование (продукт МС-ПЦР) выявлено, белый – не выявлено. При расчете корреляции по Спирману за совпадения принимали: *a* – метилирование гена миРНК в ДНК опухоли при повышении уровня экспрессии потенциального гена-мишени; *b* – деметилирование гена миРНК в ДНК опухоли при снижении уровня экспрессии потенциального гена-мишени; *в* – отсутствие изменения метилирования и экспрессии

№	<i>NKIRAS1</i>	132		212		193a		124a-1		124a-2		124a-3		34b/c		129-2		125b1	
		T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N
35	5000																		
16	500																		
12	200																		
24	100																		
29	83																		
31	70																		
8	50																		
13	50																		
20	50																		
25	50																		
28	50																		
4	20																		
17	20																		
23	20																		
26	20																		
6	10																		
9	10																		
11	10																		
15	10																		
21	10																		
27	10																		
2	2																		
1	1																		
2	1																		
5	1																		
7	1																		
10	1																		
14	1																		
18	1																		
19	1																		
22	1																		
30	1																		
32	0.33																		
33	0.005																		
34	0.001																		
		$R_s=0.8697$ $t=10.121$ $P=1.2 \times 10^{-11}$		$R_s=0.9150$ $t=13.027$ $P=1.47 \times 10^{-14}$		$R_s=0.9081$ $t=12.4539$ $P=5.09 \times 10^{-14}$		$R_s=0.9046$ $t=12.1874$ $P=9.18 \times 10^{-14}$		$R_s=0.9411$ $t=15.9896$ $P=4.20 \times 10^{-17}$		$R_s=0.9190$ $t=13.3883$ $P=6.86 \times 10^{-15}$		$R_s=0.9173$ $t=13.2331$ $P=9.51 \times 10^{-15}$		$R_s=0.8794$ $t=10.6117$ $P=3.59 \times 10^{-12}$		$R_s=0.8967$ $t=12.6356$ $P=3.20 \times 10^{-13}$	

Рис. 5. Сопоставление данных по снижению (сверху вниз) уровня мРНК *NKIRAS1* в опухолях больных НМРЛ с данными по изменению метилирования генов миРНК (*miR-132*, *miR-212*, *miR-193a*, *miR-124a-1*, *miR-124a-2*, *miR-124a-3*, *miR-34b/c*, *miR-129-2*, *miR-125b-1*) в образцах опухолей (Т) и гистологически неизмененной ткани (N) легкого. Обозначения как на рис. 4

ляет их собственную экспрессию и лишает их способности ингибировать предсказанные гены-мишени *RHOA* и/или *NKIRAS1*. Таким образом, в опухолях больных НМРЛ изменения экспрессии про-опухолевых генов *RHOA* и *NKIRAS1* могут вызывать как метилирование промоторных районов самих генов, так и метилирование регуляторных мРНК. Анализ аллельных изменений в близлежащих полиморфных маркерах позволил выявить случаи амплификации генов *RHOA* и/или *NKIRAS1*, что также может вызывать повышение содержания мРНК гена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе исследованы два уровня регуляции экспрессии генов в опухолях легкого на примере генов *RHOA* и *NKIRAS1*. Как показано, экспрессия этих генов в опухолях больных НМРЛ может изменяться на геномном уровне посредством метилирования/деметиления промоторных районов этих генов и за счет амплификации локусов, перекрывающих эти гены. Нами установлены высоко значимые корреляции между изменениями уровня мРНК и генетическими и эпигенетическими изменениями в генах, а именно, показана роль деметилирования и амплификации в повышении экспрессии генов *RHOA* и *NKIRAS1*. Полученные нами результаты о повышенной экспрессии, деметилировании и амплификации генов *RHOA* и *NKIRAS1* в опухолях больных НМРЛ свидетельствуют об онкогенных функциях *RHOA* и *NKIRAS1* при НМРЛ. Эти результаты согласуются с многочисленными подтверждениями онкогенной функции *RHOA* [15–17]. Что же касается *NKIRAS1*, то этот RAS1-подобный белок является регулятором универсального транскрипционного фактора NF-карраВ, который контролирует экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [18, 19].

Как теперь уже известно, экспрессия генов, кодирующих белки, может регулироваться под действием миРНК, связывание которой с 3'-нетранслируемым участком мРНК, обычно подавляет экспрессию гена на посттранскрипционном уровне. Причем, миРНК потенциально вовлечены в регуляцию более половины белок-кодирующих генов [8]. Однако гены миРНК, особенно супрессорных миРНК (т.е. ингибирующих онкогены), также подвержены эпигенетической инактивации в опухолях, причем, даже с большей частотой, чем гены, кодирующие белки [33]. Инактивация генов супрессорных миРНК, ассоциированная с метилированием, делает их неспособными к подавлению генов-

мишеней. При анализе основной части публикаций PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) было выявлено до 90 миРНК, для которых были получены экспериментальные данные по влиянию метилирования или деметилирования ДНК на их экспрессию в той или иной опухоли. Связь метилирования с экспрессией установлена для большинства изученных в данной работе 13 генов миРНК. Так, выявлена вовлеченность метилирования в инактивацию генов *miR-9-3*, *-124-1/-2/-3*, *-125b*, *-34b/c*, *-129-2*, *-193a* и др. в опухолях разных локализаций [26–28, 34, 35]. Нами также ранее установлена связь метилирования с содержанием при-миРНК *miR-9-1* при НМРЛ [20] и идентифицированы новые гены миРНК, метилируемые в опухолях больных НМРЛ: *miR-125b-1*, *miR-137*, *miR-375* и *miR-1258*, которые играют важную роль в сигнальных путях клетки и в патогенезе НМРЛ [32].

В представленной работе показана вовлеченность метилирования семи генов миРНК *miR-9-1/-3*, *-34b/c*, *-129-2*, *-125b-1*, *-375*, *-1258* в повышение уровня мРНК *RHOA* и 9 генов *miR-132*, *-212*, *-193a*, *124a-1/-2/-3*, *34b/c*, *129-2*, *125b-1* – в активацию экспрессии *NKIRAS1* при НМРЛ ($P < 10^{-11}$ по Спирману). При этом нами определены новые потенциальные регуляторные миРНК для протоонкогенов *RHOA* (*miR-9-1/-3*, *-34b/c*, *-129-2*, *-125b-1*, *-375*, *-1258*) и *NKIRAS1* (*miR-34b/c*, *-129-2*, *-125b-1*, *-193a*, *-124a-1/-2/-3*, *-212*, *-132*) при раке легкого. С другой стороны, впервые показано, что *RHOA* и *NKIRAS1* могут представлять новые потенциальные гены-мишени для ряда миРНК, подверженных метилированию при НМРЛ.

Неудивительно, что среди мишеней исследованных супрессорных миРНК часто встречаются мРНК типичных онкогенных белков. Так, мишенями *miR-34b/c* являются мРНК MYC, CDK4, CDK6, E2F3, CREB и MET [26, 36], в число мишеней *miR-193a* входят известные онкогены K-ras, C-kit, ERBB4 [28, 34, 37]. В более поздних работах показано, что ассоциированная с метилированием инактивация гена *miR-129-2* усиливает экспрессию онкогена *SOX4*, связанного с метастазированием [38]. К мишеням *miR-132* отнесены онкоген *Sox5* и активатор эпителиально-мезенхимального перехода, *ZEB2*, а также *CCNE1* (циклин E1) [39–41]. MiR-375, для которой предполагали специфическую роль регуляции экспрессии инсулина, оказалась регулятором нескольких важных мишеней онкогенного типа (*AEG-1*, *YAP1*, *IGF1R*, *PDK1*), причем во многих видах рака [42].

RHOA и *NKIRAS1* согласно нашим результатам и данным литературы также можно отнести к онкогенам и генам прогрессии. Согласно дан-

ным miRWalk [8], *RHOA* и *NKIRAS1* теоретически могут выполнять функции генов-мишеней исследованных 13 миРНК, однако подтверждающие экспериментальные данные пока не представлены. Сведения о регуляторных миРНК для малоизученного протоонкогена *NKIRAS1* в литературе вообще отсутствуют, а для онкогена *RHOA* также весьма ограничены. Известно пока, что мРНК *RHOA* представляет мишень для miR-122 и эта взаимодействующая пара играет важную роль в инвазии гепатоцеллюлярной карциномы и в эпителиально-мезенхимальном переходе [43].

Таким образом, в представленной работе определены новые потенциальные гены-мишени и новые потенциально регуляторные миРНК в патогенезе НМРЛ, выявлена возможность опосредованного влияния метилирования генов регуляторных миРНК на активацию генов-мишеней в опухолях легкого. Показана системная роль метилирования в регуляции генов и их взаимодействиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00828).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. (2012) Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г., *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*, **22**, 54–61.
2. ENCODE Consortium (2012) Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data, *Nature*, **489**, 91–100.
3. ENCODE Consortium (2012) Landscape of transcription in human cells, *Nature*, **489**, 101–108.
4. Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007) The epigenetics of cancer, *Cell*, **128**, 683–692.
5. Jones, P.A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, *Nature Rev. Genet.*, **13**, 484–492.
6. Heller, G., Zielinski, C.C., and Zochbauer-Muller, S. (2010) Lung cancer: from single-gene methylation to methylome profiling, *Cancer Metastasis Rev.*, **29**, 95–107.
7. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., and Shimizu, K. (2011) MicroRNAs and epigenetics, *FEBS J.*, **278**, 1598–1609.
8. Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., and Gretz, N. (2011) miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by «walking» the genes of three genomes, *J. Biomed. Inform.*, **44**, 839–847.
9. Dreijerink, K., Braga, E., Kuzmin, I., Geil, L., Duh, F.-M., Angeloni, D., Zbar, B., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J., Minna, J.D., Protopopov, A., Li, J., Kashuba, V., Klein, G., and Zbarovsky, E. (2001) The candidate tumor suppressor gene, *RASSF1A*, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7504–7509.
10. Zbarovsky, E.R., Senchenko, V., Loginov, V., Pavlova, T., Zbarovska, V., Dmitriev, A., Lung, M., Panda, C.K., Kashuba, V., Lerman, M.I., and Braga, E.A. (2011) Positional cloning of tumor suppressor genes from 3p21.3 involved in major human cancers (Columbus, F., ed.), in *Horizons in Cancer Research*, Nova Science Publishers, Inc., N.Y., **42**, 103–127.
11. Braga, E., Senchenko, V., Bazov, I., Loginov, W., Ermilova, V., Kazubskaya, T., Garkavtseva, R., Mazurenko, N., Kisseljov, F., Liu, J., Kisselev, L., Lerman, M., Klein, G., and Zbarovsky, E. (2002) Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3p regions in major human epithelial malignancies: allelotyping and quantitative real time PCR, *Int. J. Cancer*, **100**, 534–541.
12. Логинов В.И., Базов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. (2008) Районы потенциальных генов-супрессоров эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников на хромосоме 3 человека, *Генетика*, **44**, 250–256.
13. Braga, E., Loginov, W., Khodyrev, D., Pronina, I., Kazubskaya, T., Bogatyrova, O., Kashuba, V.I., Senchenko, V.N., Klein, G., Lerman, M.I., Kisselev, L.L., and Zbarovsky, E.R. (2011) A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes, *Exp. Oncol.*, **33**, 33–41.
14. Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Ivanova, T., Braga, E., Zbarovsky, E., and Lerman, M.I. (2007) Hypermethylation of Ron proximal promoter associates with lack of full-length Ron and transcription of oncogenic short-Ron from an internal promoter, *Oncogene*, **26**, 4499–4512.
15. Pille J.Y., Denoyelle C., Varet J., Bertrand J.R., Soria J., Opolon P., Lu H., Pritchard L.L., Vannier J.P., Malvy C., Soria C., and Li H. (2005) Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Ther.*, **11**, 267–274.
16. Брага Э.А., Логинов В.И., Климов Е.А., Килосанидзе Г., Ходырев Д.С., Каганова Н.Л., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Пронина И.В., Рудько О.И., Забаровский Е.Р., Сулимова Г.Е., Киселев Л.Л. (2006) Активация транскрипции гена *RHOA* в эпителиальных опухолях может быть вызвана умножением копий гена и/или деметилированием его промоторной области, *Молекулярная биология*, **40**, 865–877.
17. Ma, L., Liu, Y.P., Geng, C.Z., Wang, X.L., Wang, Y.J., and Zhang, X.H. (2010) Overexpression of RhoA is associated with progression in invasive breast duct carcinoma, *Breast J.*, **16**, 105–107.
18. Fenwick, C., Na, S.Y., Voll, R.E., Zhong, H., Im, S.Y., Lee, J.W., and Ghosh, S. (2000) A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IκappaB, *Science*, **287**, 869–873.
19. Chen, Y., Válee, S., Wu, J., Vu, D., Sondek, J., and Ghosh, G. (2004) Inhibition of NF-κappaB activity by IκappaBβ in association with κappaB-Ras, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 3048–3056.
20. Ходырев Д.С., Пронина И.В., Рыков С.В., Береснева Е.В., Фридман М.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. (2012) Метилирование группы генов микроРНК вовлечено в регуляцию экспрессии генов-мишеней *RAR-beta2* и *NKIRAS1* при раке легкого, *Молекулярная биология*, **46**, 773–785.

21. Логинов В.И., Пронина И.В., Бурденный А.М., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Брага Э.А., Кубатиев А.А., Кушлинский Н.Е. (2014) Роль метилирования в регуляции экспрессии функционально значимых генов хромосомы 3: *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* – в опухолях молочной железы, *Молекулярная медицина*, **6**, 30–37.
22. Sobin, L.Y., and Wittekind, Ch. (2002) UICC TNM classification of malignant tumours, Wiley-Liss INC Publ., N.Y., 193–195.
23. Travis, W.D., Coby, T.V., Corrin, B., Shimosato, Y., and Brambilla, E. (1999) *World Health Organization International Histological Classification of Tumours; histological typing of lung and pleural tumours*, Berlin, Springer.
24. Пронина И.В., Логинов В.И., Прасолов В.С., Климов Е.А., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Гарькавцева Р.Ф., Сулимова Г.Е., Брага Э.А. (2009) Изменение уровня экспрессии гена *SEMA3B* в эпителиальных опухолях, *Молекулярная биология*, **43**, 439–445.
25. Horiuchi, A., Imai, T., Wang, C., Ohira, S., Feng, Y., Nikaido, T., and Konishi, I. (2003) Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma, *Lab. Invest.*, **83**, 861–870.
26. Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., Gallagher, W.M., Eccles, S.A., Croce, C.M., and Esteller, M.A. (2008) microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13556–13561.
27. Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Sugiyama, T., and Ushijima, T. (2009) DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: it's possible involvement in the formation of epigenetic field defect, *Int. J. Cancer*, **124**, 2367–2374.
28. Bandres, E., Agirre, X., Bitarte, N., Ramirez, N., Zarate, R., Roman-Gomez, J., Prosper, F., and Garcia-Foncillas, J. (2009) Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer, *Int. J. Cancer*, **125**, 2737–2743.
29. Soto-Reyes, E., Gonzalez-Barrios, R., Cisneros-Soberanis, F., Herrera-Goepfert, R., Perez, V., Cantu, D., Prada, D., Castro, C., Recillas-Targa, F., and Herrera, L.A. (2012) Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers, *BMC Cancer*, **12**, 40.
30. Angeloni, D., ter Elst, A., Wei, M.H., van der Veen, A.Y., Braga, E.A., Klimov, E.A., Timmer, T., Korobeinikova, L., Lerman, M.I., and Buys, C.H. (2006) Analysis of a new homozygous deletion in the tumor suppressor region at 3p12.3 reveals two novel intronic noncoding RNA genes, *Genes Chromosom. Cancer*, **45**, 676–691.
31. Береснева Е.В., Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Ермилова В.Д., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. (2013) Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечноклеточном раке. Связь с прогрессией рака, *Генетика*, **49**, 366–375.
32. Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. (2013) Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого, *Генетика*, **49**, 896–901.
33. Kunej, T., Godnic, I., Ferdin, J., Horvat, S., Dovic, P., and Calin, G.A. (2011) Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature, *Mutat. Res.*, **717**, 77–84.
34. Gao, X.N., Lin, J., Li, Y.H., Gao, L., Wang, X.R., Wang, W., Kang, H.Y., Yan, G.T., Wang, L.L., and Yu, L. (2011) MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia, *Oncogene*, **30**, 3416–3428.
35. Heller, G., Weinzierl, M., Noll, C., Babinsky, V., Ziegler, B., Altenberger, C., Minichsdorfer, C., Lang, G., Dome, B., End-Pfutzenreuter, A., Arns, B.M., Grin, Y., Klepetko, W., Zielinski, C.C., and Zochbauer-Muller, S. (2012) Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers, *Clin. Cancer Res.*, **18**, 1619–1629.
36. Cannell, I.G., and Bushell, M. (2010) Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability, *Cell Cycle*, **9**, 2726–2730.
37. Yu, T., Li, J., Yan, M., Liu, L., Lin, H., Zhao, F., Sun, L., Zhang, Y., Cui, Y., Zhang, F., Li, J., He, X., and Yao, M. (2014) MicroRNA-193a-3p and -5p suppress the metastasis of human non-small-cell lung cancer by downregulating the ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2 signaling pathway, *Oncogene*, DOI: 10.1038.
38. Chen, X., Zhang, L., Zhang, T., Hao, M., Zhang, X., Zhang, J., Xie, Q., Wang, Y., Guo, M., Zhuang, H., and Lu, F. (2013) Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC, *Liver Int.*, **33**, 476–486.
39. Renjie, W., and Haiqian, L. (2014) MiR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5, *Cancer Lett.*, DOI: 10.1016.
40. You, J., Li, Y., Fang, N., Liu, B., Zu, L., Chang, R., Li, X., and Zhou, Q. (2014) MiR-132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells via targeting the EMT regulator ZEB2, *PLoS One*, **9**, e91827.
41. Wang, J., Xu, G., Shen, F., and Kang, Y. (2014) miR-132 targeting cyclin E1 suppresses cell proliferation in osteosarcoma cells, *Tumour Biol.*, **35**, 4859–4865.
42. Yan, J.W., Lin, J.S., and He, X.X. (2014) The emerging role of miR-375 in cancer, *Int. J. Cancer*, **135**, 1011–1018.
43. Wang, S.C., Lin, X.L., Li, J., Zhang, T.T., Wang, H.Y., Shi, J.W., Yang, S., Zhao, W.T., Xie, R.Y., Wei, F., Qin, Y.J., Chen, L., Yang, J., Yao, K.T., and Xiao, D. (2014) MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA, *PLoS One*, **9**, e101330.

**UPREGULATION OF *RHOA* AND *NKIRAS1*
GENES IN LUNG TUMORS IS ASSOCIATED
WITH THEIR METHYLATION LOSS
AND WITH METHYLATION OF REGULATORY
MIRNA GENES**

**E. A. Braga^{1,2*}, V. I. Loginov^{1,2}, I. V. Pronina^{1,2},
D. S. Khodyrev³, S. V. Rykov⁴, A. M. Burdennyi¹,
M. V. Friedman⁵, T. P. Kazubskaya⁶, A. A. Kubatiev¹,
N. E. Kushlinskii⁶**

¹ *Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia; fax: +7(495)601-2366, E-mail: eleonora10_45@mail.ru*

² *Research Center of Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow 115478, Russia; fax: +7(499)324-0702, E-mail: karpukhin@med-gen.ru*

³ *Federal Medical and Biological Agency of Russia Federal Research Clinical Center of specialized types of medical care and medical technologies, Moscow 115682, Russia; fax: +7(495)395-6430, E-mail: DmKh8@mail.ru*

⁴ *Russian State Genetics Center GosNIIGenetika, Moscow 117545, Russia; fax: +7(495)315-0501, E-mail: genetika@genetika.ru*

⁵ *N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 117971, Russia; fax: +7(499)135-6213, E-mail: iogen@vigg.ru*

⁶ *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow 115478, Russia; fax: +7(499)324-6352, E-mail: biochimia@mtu-net.ru*

Received November 30, 2014

Revision received January 15, 2015

CpG-island methylation of promoter regions and interactions of miRNA with messenger RNA are involved in a complex of different mechanisms of regulation of gene expression. The aim of present study was to assess the contribution of miRNA gene methylation to their target gene upregulation in lung tumors. Using common non-small cell lung cancer samples we found a significant ($p < 10^{-11}$ by Spearman) correlation of *RHOA* and *NKIRAS1* mRNA level increase with their CpG-island methylation loss as well as with methylation of some miRNA genes predicted as regulatory by the miRWalk database. Novel potential regulatory miRNAs for *RHOA* (miR-9-1/-3, -34b/c, -129-2, -125b-1, -375, -1258) and for *NKIRAS1* (miR-34b/c, -129-2, -125b-1, -193a, -124a-1/-2/-3, -212, -132) were found in lung cancer.

Key words: CpG-islands, methylation, miRNAs, target genes, *RHOA*, *NKIRAS1*, mRNA, lung cancer