

УДК 575:599.9

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГРУППЫ ГЕНОВ микроРНК ВОВЛЕЧЕНО В РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ *RAR-beta2* И *NKIRAS1* ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

© 2012 г. Д. С. Ходырев¹, И. В. Пронина¹, С. В. Рыков¹, Е. В. Береснева¹, М. В. Фридман¹,
Т. П. Казубская², В. И. Логинов^{1*}, Э. А. Брага^{1**}

¹Государственный научный центр “ГосНИИгенетика”, Москва, 117545

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук,
Москва, 115478

Поступила в редакцию 20.12.2011 г.

Принята к печати 20.02.2012 г.

К настоящему времени известно более 2000 микроРНК человека, каждая из которых может участвовать в регуляции работы сотен белоккодирующих генов-мишеней. На экспрессию генов микроРНК в свою очередь влияет метилирование CpG-островков. Наша цель состояла в оценке роли метилирования в регуляции экспрессии генов микроРНК и, как следствие, в регуляции экспрессии генов-мишеней в первичных опухолях легкого. С использованием единой коллекции образцов немелкоклеточного рака легкого определен статус метилирования и уровень экспрессии группы генов микроРНК и их потенциальных генов-мишеней *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, локализованных на хромосоме 3. Выявлено статистически значимое ($P \leq 0.05$ по Фишеру) повышение частоты метилирования генов *miR-9-1* и *miR-34b/c* в опухолях легкого по сравнению с гистологически нормальной тканью и маргинально значимое ($P \leq 0.1$) — *miR-9-3* и *miR-193a*. Установлена значимая корреляция между изменениями метилирования и уровнем экспрессии гена *miR-9-1* ($P \approx 5 \times 10^{-12}$ по Спирману), что позволяет предположить участие метилирования в регуляции экспрессии этого гена микроРНК в опухолях легкого. Кроме того, обнаружена значимая отрицательная корреляция ($P \approx 3 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-13}$ по Спирману) между изменениями уровней экспрессии *miR-9-1* и *miR-17* и гена-мишени *RAR-beta2*, и между изменениями уровней экспрессии *miR-17* и *NKIRAS1*. Обратная зависимость между уровнями экспрессии генов микроРНК и их генов-мишеней согласуется с известным механизмом подавления экспрессии белоккодирующих генов под действием микроРНК. Впервые определены значимые корреляции ($P \approx 3 \times 10^{-10} - 4 \times 10^{-13}$ по Спирману) между изменениями метилирования генов микроРНК (*miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*, *miR-193a*) и экспрессией *RAR-beta2*, а также между изменениями метилирования генов *miR-34b/c* и *miR-193a* и уровнем экспрессии *NKIRAS1*. Эти результаты указывают на возможность опосредованного влияния метилирования генов ряда микроРНК на изменение экспрессии генов-мишеней.

Ключевые слова: гены микроРНК, мишени микроРНК, гены *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, метилирование, метилспецифичная ПЦР, мРНК, при-микроРНК, первичные опухоли легкого.

METHYLATION OF SOME miRNA GENES IS INVOLVED IN THE REGULATION OF THEIR TARGET GENES *RAR-beta2* AND *NKIRAS1* EXPRESSION IN LUNG CANCER, by D. S. Khodyrev¹, I. V. Pronina¹, S. V. Rykov¹, E. V. Beresneva¹, M. V. Freedman¹, T. P. Kazubskaya², V. I. Loginov^{1*}, E. A. Braga^{1**} (1State Research Centre “GosNIIGenetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: loginov7@genetika.ru, ** ebraga@genetika.ru; 2Blokhin Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). To date, there are more than two thousand human miRNAs, each of them may be involved in the regulation of hundreds of protein coding target genes. Methylation of CpG-islands, in turn, affects miRNAs gene expression. Our aim was to evaluate the role of methylation in the regulation of miRNA gene expression and, consequently, in the regulation of expression of target genes in primary lung tumors. Using a common collection of non-small cell lung cancer samples we performed a comprehensive study, including analysis of the methylation status and expression levels of some miRNA genes and their potential target genes on chromosome 3: *RAR-beta2* and *NKIRAS1*. Increased frequency of methylation in lung tumors compared to histologically normal tissue was revealed for *miR-9-1* and *miR-34b/c* genes with significant statistics ($P \leq 0.05$ by Fisher exact test) and for *miR-9-3* and *miR-193a* was marginally

Принятые сокращения: МС-ПЦР — метилспецифичная полимеразная цепная реакция; НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого; ОТ-ПЦР — (здесь) полимеразная цепная реакция на кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции РНК; при-микроРНК — первичный предшественник микроРНК; miR — микроРНК (miRNA).

* Эл. почта: loginov7@genetika.ru, ** ebraga@genetika.ru

significant ($P \leq 0.1$). Significant correlation was revealed between alterations of methylation and expression level of *miR-9-1* gene ($P \approx 5 \times 10^{-12}$ by Spearman) in the lung tumors, this suggests the role of methylation in the regulation of expression of this miRNA genes. Besides, a statistically significant negative correlation ($P \approx 3 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-13}$ by Spearman) was found between alterations of expression levels of *miR-9-1* and *miR-17* and *RAR-beta2* target gene and also between expression level alterations of *miR-17* and *NKIRAS1* that was not previously analyzed. The inverse relationship between expression levels of miRNA genes and their target genes is consistent with the known mechanism of suppression of protein coding genes expression under the action of miRNAs. For the first time significant correlations ($P \approx 3 \times 10^{-10} - 4 \times 10^{-13}$ by Spearman) were shown between alterations of methylation status of miRNA genes (*miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*, *miR-193a*) and the expression level of *RAR-beta2* target gene and between alterations of methylation status of *miR-34b/c*, and *miR-193a* and the expression level of *NKIRAS1* target gene in the primary lung tumors, which suggests the possibility of indirect effects of methylation of miRNA genes on expression level of target genes.

Keywords: miRNA genes, *RAR-beta2* and *NKIRAS1* target genes, methylation, methylation-specific PCR, expression level, mRNA, pri-miRNA, primary lung tumors.

Нарушения экспрессии генов при онкогенезе связывают с метилированием ДНК и модификациями гистонов, с транскрипционными и другими белковыми факторами, а также с малыми РНК, в том числе с микроРНК. Обнаружение микроРНК стало революционным открытием в молекулярной биологии. К настоящему времени известно более двух тысяч микроРНК человека (miRBase, <http://www.mirbase.org/>, Release 18, November 2011), каждая из которых может регулировать работу сотен генов-мишеней [1, 2] (TargetScan (<http://www.targetscan.org/>, Release 6.0, November 2011)). Считается, что экспрессия 30% белоккодирующих генов человека может регулироваться микроРНК [1]. МикроРНК контролируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, вызывая деградацию мРНК-мишеней или нарушение трансляции [3, 4].

Вовлеченность микроРНК в процесс канцерогенеза позволила создать представление об “онкомирах” (oncomirs), т.е. о тех микроРНК, нарушение экспрессии которых способствует образованию опухолей [5–7]. Крайне плодотворным стало изучение экспрессии генов микроРНК при разных видах рака. Профили экспрессии рассматривают как “микроРНК-паспорта” (signatures miRNAs), так как они оказались высоко специфичными для рака легкого, толстой кишки, почки, яичников, молочной железы и их гистологических типов [8]. Механизмы регуляции экспрессии генов микроРНК остаются малоизученными. Метилирование CpG-островка, прилежащего к гену микроРНК или перекрывающего его, считается одним из путей подавления экспрессии генов микроРНК и затрагивает, как полагают, 10% генов микроРНК [9]. Профили метилирования генов микроРНК также нашли широкое применение в диагностике онкологических заболеваний и прогнозе их течения [10]. Сведения о возможной роли микроРНК в регуляции экспрессии белоккодирующих генов (генов-мишеней) основаны главным образом на биоинформатических

данных, представленных, например, в базах данных TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) и miR2Disease Base (<http://www.mir2disease.org/>). Экспериментально регуляторные функции микроРНК изучали в основном на линиях опухолевых клеток [11–13].

В представленной работе впервые определен статус метилирования группы генов микроРНК и изменение уровня экспрессии белоккодирующих генов хромосомы 3 *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, предполагаемых генов-мишеней этих микроРНК (TargetScan, <http://www.targetscan.org/>), в первичных опухолях легкого. Наша цель состояла в оценке роли метилирования в регуляции экспрессии генов микроРНК и, как следствие, их генов-мишеней.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор генов микроРНК, связанных с развитием опухолей и перекрывающихся с CpG-островками, а также поиск их генов-мишеней проводили с привлечением следующих баз данных: UCSC Genome Browser (hg 18 (<http://genome.ucsc.edu/>)), miRBase (<http://www.mirbase.org/>), MicroRNADB (<http://bioinfo.au.tsinghua.edu.cn/micromadb/>), miRDB (<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>), miRGen (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), miR2Disease Base (<http://www.mir2disease.org/>), miRWalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), CpGcluster (<http://bioinfo2.ugr.es/CpGcluster/>).

Образцы немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) были получены и клинически охарактеризованы в НИИ КО РОНЦ РАМН. Использовали первичные опухоли легкого только от тех больных, которые до операции не подвергались лучевой или химиотерапии. Все опухоли были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза (UICC, версия 2002 г.) и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной Организации Здравоохранения.

нения [14, 15]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (35 мкм), окрашенных эозином и гематоксилином. Образцы тканей хранили при -70°C . Анализировали парные образцы опухолевой и гистологически нормальной ткани от 44 больных НМРЛ. В качестве дополнительного контроля использовали ткани легкого пяти человек без онкологических заболеваний в анамнезе.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР) проводили как описано ранее [16, 17]. ДНК после обработки бисульфитом очищали, используя колонки Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 (“Millipore”). Метилирование каждой микроРНК анализировали с использованием двух пар праймеров, специфичных как к метилированному, так и к неметилированному аллелю [10, 18, 19] (табл. 1). Праймеры, температура отжига ($T_{\text{отж}}$) и размеры продукта для пяти микроРНК приведены в табл. 1. Амплификацию проводили по программе: 94°C , 3 мин; 35 циклов { 94°C , 10 с; $T_{\text{отж}}$ (табл. 1), 20 с.; 72°C , 30 с}; 72°C , 3 мин. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad Cyler (“Bio-Rad”). Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК. Образцы ДНК из лейкоцитов крови здоровых доноров использовали в качестве контроля для неметилированных аллелей. В качестве положительного контроля 100%-го метилирования использовали препараты ДНК из лейкоцитов, обработанные метилтрансферазой SssI (“СибЭнзим”, Россия). Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле, либо в 10%-м полиакриламидном геле.

Суммарную РНК выделяли из ткани опухоли и прилегающей гистологически нормальной ткани с помощью модифицированного метода экстракции смесью гуанидинизотиоцианатфенолхлороформ [20], как описано ранее [21]. Образцы РНК перед исследованием обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКаз. Образец инкубировали в течение 5–10 мин при температуре 33°C в 100 мкл ДНКазного буфера, содержащего 20 mM Трис-HCl, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , pH 7.6, а также 20 ед. акт. экзонуклеазы I (ExoI, “Fermentas”, Литва) и 5 ед. акт. ДНКазы (DNaseI, RNase-free, “Fermentas”). Отсутствие ДНК в образцах контролировали с помощью ПЦР с праймерами к гену главного комплекса гистосовместимости *MHCI* как описано ранее [21]. Водный раствор РНК хранили при температуре -40°C .

кДНК синтезировали на матрице суммарной РНК с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони (M-MuLV Reverse Transcriptase, “Fermentas”) и вырожденных гептамеров (random heptamers) в качестве праймеров

[21] по протоколу, предлагаемому фирмой “Fermentas”.

Праймеры, условия проведения ОТ-ПЦР и анализ данных ОТ-ПЦР. Уровень экспрессии микроРНК оценивали по содержанию при-микроРНК (фрагмент кДНК, перекрывающий главным образом пре-микроРНК). Следует отметить, что корреляция между содержанием ряда зрелых микроРНК и их предшественников (при- и пре-микроРНК) в опухолевых и условно нормальных тканях разной локализации [22, 23] была выявлена ранее. Содержание при-микроРНК и мРНК структурных генов определяли методом полуквантитативной ОТ-ПЦР. Ген *B2M* использовали в качестве контрольного, поскольку количество мРНК этого гена одинаково в разных тканях человека и в опухолях разного происхождения [24, 25]. Содержание мРНК гена *RAR-beta2* и при-микроРНК *mir-17* анализировали при помощи праймеров, приведенных в [26, 27], содержание мРНК *NKIRAS1* и при-микроРНК генов *miR-9-1*, *miR-129-2*, *miR-24-2* – с использованием подобранных нами праймеров (табл. 1). ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей 67 mM Трис-HCl-буфер, pH 8.8, 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Твин-20, по 0.2 mM каждого dNTP, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 мкМ праймеры, а также 2 мкл кДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной Taq-ДНК-полимеразы (“Fermentas”). Реакцию амплификации проводили по программе: 95°C , 5 мин; 35–38 циклов (см. далее): 94°C , 15 с, $T_{\text{отж}}$ (табл. 1) 25 с, 72°C , 45 с; 72°C , 2 мин на амплификаторе DNA Engine Dyad Cyler (“Bio-Rad”). Продукты амплификации анализировали в 2%-м агарозном геле с 0.5 мкг/мл бромида этидия. Соответствие амплификатов генов *NKIRAS1*, *miR-9-1* и *miR-129-2* фрагментам кДНК этих генов (по данным базы NCBI) подтверждено с помощью прямого секвенирования продуктов ПЦР. Подбирали оптимальные условия ОТ-ПЦР для каждого гена, обеспечивающие линейную зависимость между числом циклов и количеством продуктов ПЦР. Аликвоты реакционной смеси отбирали после 30, 32, 35, 38 и 40 циклов. Результаты ОТ-ПЦР обрабатывали с применением гель-документирующей системы ViTran PHOTO (“Биоком”, Россия). Интенсивность полос после электрофоретического разделения продуктов ПЦР оценивали количественно при помощи программы для денситометрии фотографий GeneProfiler (<http://www.scanalytics.com>) и выражали в виде значений относительной интенсивности. В статистических расчетах использовали данные денситометрии гелей, где интенсивность наиболее ярких полос достигала максимума, но еще не выходила на плато. Учитывали случаи с изменением содержания мРНК и при-микроРНК генов (увеличение или уменьшение) в образцах опухолей по сравнению с образ-

Таблица 1. Праймеры, условия и продукты метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) для пяти генов микроРНК и ОТ-ПЦР для генов *RAR-beta2*, *NKIRAS1* и четырех генов микроРНК

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')*	$T_{отж}$, °C	Размер продукта, п.н.	Ссылка
МС-ПЦР				
<i>miR-193a</i>	MF: gaggtagtttggtcggagcgtac MR: gacccccgaaccaacg	56	86	[18]
	UF: attgattatattttgagagtgtg UR: tcccaactaacatacactcca	50	153	[18]
<i>miR-129-2</i>	MF: gattttagttcgtattaatgagttggcggttc MR: aacccccgactacaaaatcgcg	54	210	[19]
	UF: tgattttagttgtattaatgagttgggttttg UR: accaaccctaacatacaaatcaca	54	210	[19]
<i>miR-9-1</i>	MF: tttttttcgttgacgggc MR: cccgcctcctaactactatcg	52	120	[10]
	UF: tttttttattttgtgatgggt UR: cccacctcctaactactatcacc	55	120	[10]
<i>miR-9-3</i>	MF: ggtgttaggacgtacggaac MR2: taccggaatcctaaaacgc	54	180	[10]
	UF2: ggtgttaggatgtatggaat UR: taccctaacctctaaaacac	54	170	[10]
<i>miR-34b/c</i>	MF: tttagttacgcgtgtgtgctg MR: actacaactcccgaacgatc	57	185	[10]
	UF: tggtttagttatgtgtgtgtgt UR: caactacaactcccgaacatcc	57	190	[10]
ОТ-ПЦР				
<i>RARbeta2</i>	F: atcgatgcccaactactgtgga R: gactcgatggctcagcactg	55	239	[26]
<i>NKIRAS1</i>	F: atttgctgatggcttctgtctgt R: actttctcactttttgccactgc	54	201	*
<i>miR-9-1</i>	F: caggaggggggtgtgtgtatc R: gggcccctctgcgcagtgtatgg	65	116	*
<i>miR-129-2</i>	F: acggtctggagaatggaga R: ggctccggctattgagttatgta	59	234	*
<i>mir-17</i>	F: cccattagggattatgctg R: cctgcactttaagcccaact	59	254	[27]
<i>miR-24-2</i>	F: agggcttagctgctgtg ag R: ctgttctgctgaactgag	56.5	220	*
<i>B2M</i>	R: caaatgcggcatcttcaaacctc	64	80	[24]

* Праймеры подобраны с помощью программы Primer Select из пакета программ Lasergene7.

Примечание. M, methylated – специфичный к метилированному аллелю; U, unmethylated – специфичный к неметилированному аллелю.

цами нормальной ткани того же больного в 5 и более раз.

Статистический анализ данных проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0.05. Рассматривали также статистически маргинально значи-

мые результаты ($0.05 < P \leq 0.1$), что соответствует доверительному интервалу 94% (в отличие от стандартного доверительного интервала 95% при $P = 0.05$). Конкордантность данных по метилированию и экспрессии генов микроРНК и генов-мишеней *RAR-beta2* и *NKIRAS1* оценива-

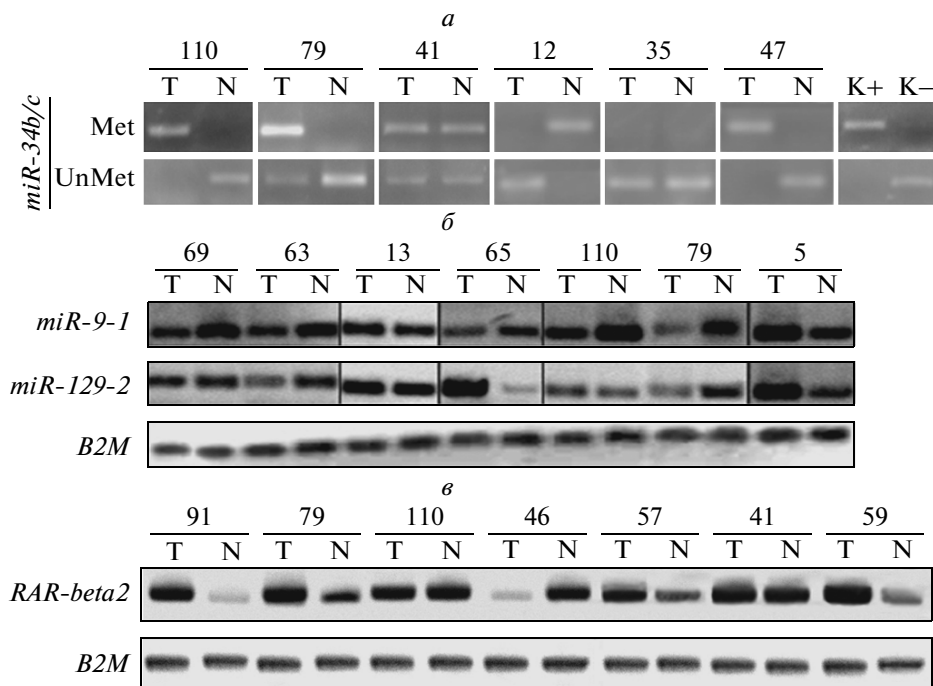


Рис. 1. *a* – Репрезентативные примеры амплификации продуктов МС-ПЦР гена микроРНК *miR-34b/c* в парных (опухоль/норма) образцах НМРЛ. (К–) – отрицательный контроль, продукты МС-ПЦР на образцах ДНК из лейкоцитов крови здоровых доноров. (К+) – положительный контроль, продукты МС-ПЦР на ДНК из лейкоцитов, обработанных метилтрансферазой SssI (“СибЭнзим”, Россия). *б* – Продукты ОТ-ПЦР генов *miR-9-1* и *miR-129-2* (содержание при-микроРНК) и контрольного гена *B2M* в парных образцах НМРЛ. *в* – Продукты ОТ-ПЦР гена *RAR-beta2* и контрольного гена *B2M* в парных образцах НМРЛ. Продукты ПЦР разделяли в 2%-м агарозном геле. Условия ПЦР и размер амплифицированных фрагментов приведены в табл. 1.

ли с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмана. Значимость корреляции по Спирману (*R_s*) проверяли с помощью *t*-теста

Стьюдента: $t = R_s / \sqrt{((1 - R_s^2) / (N - 2))}$ с числом степеней свободы $\nu = N - 2$, где *N* – размер выборки. Уровень значимости принят равным 10^{-6} .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Профиль метилирования группы генов микроРНК при НМРЛ

Методом метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) на ДНК, подвергнутой бисульфитной конверсии, изучено метилирование CpG-островков пяти генов микроРНК (*miR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-193a* и *-129-2*) в образцах НМРЛ. На рис. 1*a* приведены примеры анализа продуктов МС-ПЦР гена *miR-34b/c*.

Определены частоты метилирования пяти генов микроРНК в образцах опухолей легкого и условно нормальной ткани, полученных от 44 больных НМРЛ (табл. 2). Выявлено статистически значимое ($P \leq 0.05$ по Фишеру) повышение частоты метилирования генов *miR-9-1* и *miR-34b/c* в опухолях легкого по сравнению с гистологически нормальной тканью и маргинально значимое ($P \leq 0.1$) *miR-9-3* и *miR-193a* (табл. 2).

Обращает на себя внимание высокая частота метилирования генов *miR-9-3* и *miR-193a* в условно нормальной ткани, достигающая 41% (18/44) и 43% (16/37), и генов *miR-9-1*, *-34b/c* и *-129-2* – до 23% (10, 9 и 10 из 44 образцов соответственно) (табл. 2). Причем метилирование генов *miR-193a*, *9-3*, *9-1* обнаружено и в опухоли, и в условно нормальной ткани (в 11/37 (30%), 8/44 (20%) и 4/44 (10%) образцов НМРЛ соответственно). Следует сказать, что не выявлено метилирования всех исследованных генов микроРНК (*miR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-193a* и *-129-2*) в образцах ДНК, выделенных из тканей легкого здоровых доноров (пять человек без онкологических заболеваний в анамнезе). Повышенное метилирование ряда генов микроРНК в гистологически нормальных тканях больных при отсутствии их метилирования в тканях легкого здоровых доноров позволяет предполагать, что метилирование некоторых генов микроРНК представляет раннее событие в патогенезе опухолей, которое может опережать появление патоморфологических изменений.

Следует отметить также высокую частоту метилирования ряда генов микроРНК в условно нормальной ткани при его отсутствии в парной опухоли, что рассматривается как потеря метилирования или деметилирование. Так, обнаружено,

Таблица 2. Частоты метилирования генов микроРНК в образцах немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и прилежащей гистологически нормальной ткани*

Ген микроРНК	НМРЛ		
<i>miR-193a</i> (17q.11.2)	T	24/37, 65%	$P = 0.1$
	N	16/37, 43%	
<i>miR-129-2</i> (11p11.2)	T	13/44, 29%	$P > 0.1$
	N	10/44, 23%	
<i>miR-9-1</i> (1q22)	T	23/44, 52%	$P = 0.008$
	N	10/44, 23%	
<i>miR-9-3</i> (15q26.1)	T	27/44, 61%	$P = 0.087$
	N	18/44, 41%	
<i>miR-34b/c</i> (11q23.1)	T	27/44, 61%	$P = 1.8 \times 10^{-4}$
	N	9/44, 20%	

* Статистическую значимость рассчитывали при помощи теста Фишера.

Примечание. Полужирным выделены показатели статистически ($P \leq 0.05$) и маргинально значимых ($0.05 < P \leq 0.1$) различий (различие значимо на 94% в отличие от стандартного доверительного интервала 95% при $P = 0.05$).

что гены *miR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c* и *-129-2* деметилированы в 6 (14%), 10 (23%), 7 (16%) и 9 (20%) образцах НМРЛ из 44. Сопоставление этих результатов с клинико-гистологическими данными показало, что деметилирование генов *miR-9-1*, *-9-3* и *-34b/c* чаще выявляется на более поздних стадиях заболевания (стадия III–IV или третья степень анаплазии). А именно, поздним стадиям соответствуют 6/6, 10/10 и 5/7 образцов, в которых деметилированы гены *miR-9-1*, *-9-3* и *-34b/c*. Любопытно, что в случае образца №5 (тяжелая клиническая стадия IV, третья степень анаплазии, метастазы в лимфоузлах и других органах, T2N2M1) все пять исследованных генов, деметилированные в опухоли, были метилированы в условно нормальной ткани (см. рис. 2 и рис. 3). Эти данные согласуются с представлениями о связи процесса деметилирования с прогрессией опухолей и о полном гипометилировании на поздних стадиях рака [28].

Метилирование генов микроРНК и содержание при-микроРНК при НМРЛ

Изменения экспрессии четырех генов микроРНК (*miR-9-1*, *miR-129-2*, *miR-24-2* и *miR-17*) оценили по содержанию при-микроРНК методом полуколичественной ОТ-ПЦР. На рис. 1б приведены примеры анализа продуктов ОТ-ПЦР генов *miR-9-1* и *miR-129-2* при НМРЛ. В работе использовали образцы НМРЛ, в которых анали-

зировали и метилирование группы генов микроРНК (34 из 44 образцов).

Из рис. 2 видно, что содержание при-микроРНК *miR-9-1* в образцах НМРЛ снижается в 4 раза чаще, чем повышается (16/34 против 4/34, $P = 0.003$ по Фишеру). Содержание при-микроРНК *miR-17* снижается в 3 раза чаще, чем повышается (15/34 против 6/34, $P = 0.034$ по Фишеру, см. табл. 3). Напротив, содержание при-микроРНК *miR-24-2* при НМРЛ повышается в 15 раз чаще, чем понижается (15/34 против 1/34, $P = 9 \times 10^{-5}$ по Фишеру). Согласно этим данным, микроРНК *miR-9-1* и *miR-17* могут, по-видимому, проявлять свойства генов-супрессоров, а *miR-24-2* – онкогенов.

Мы проанализировали возможные корреляции между изменениями статуса метилирования и уровня экспрессии генов микроРНК *miR-9-1* и *miR-129-2*, содержащих CpG-островка, при НМРЛ (рис. 2). Оказалось, что в 16 из 17 образцов НМРЛ, в которых ген *miR-9-1* метилирован, уровень при-микроРНК снижен (16/17 против 1/17, $P = 2.5 \times 10^{-7}$ по Фишеру), а деметилирование этого гена, обнаруженное в шести образцах, в четырех из них сочеталось с повышением уровня при-микроРНК. При помощи непараметрической статистики выявлена значимая корреляция между изменением содержания при-микроРНК и изменением статуса метилирования гена *miR-9-1* ($P = 4.5 \times 10^{-12}$ по Спирману, рис. 2); для гена *miR-129-2* значимую корреляцию не выявили. Таким образом, показана связь между уровнем экспрессии и метилированием CpG-островка гена *miR-9-1*, что указывает на возможность эпигенетической регуляции этого гена при НМРЛ.

Содержание при-микроРНК *miR-9-1*, *miR-17* и мРНК *RAR-beta2* и *NKIRAS1*

Нами проанализированы изменения уровней экспрессии опухоль-ассоциированных генов *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, локализованных на хромосоме 3, предположительно регулируемых микроРНК *miR-9-1* и *miR-17*. На рис. 1в приведены примеры анализа продуктов ОТ-ПЦР гена *RAR-beta2* в образцах НМРЛ. В табл. 3 суммированы данные для 34 образцов НМРЛ. Показано статистически значимое увеличение образцов НМРЛ, в которых уровень мРНК генов *RAR-beta2* (18/34 против 3/34, $P = 2 \times 10^{-4}$ по Фишеру) и *NKIRAS1* (21/34 против 3/34, $P = 0.8 \times 10^{-5}$ по Фишеру) повышен (в 5 раз или более) по сравнению с условно нормальной тканью.

Мы сопоставили изменения содержания при-микроРНК *miR-9-1* и *miR-17* в первичных опухолях легкого (по сравнению с условно нормальной тканью) и изменения количества мРНК *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, рассматриваемых в качестве потенциальных генов-мишеней этих микроРНК

Рис. 2. Статус метилирования и соотношение уровней экспрессии (Exp, количество при-микроРНК) гена *miR-9-1* в образцах опухолей легкого (Т) и в образцах прилежащей гистологически нормальной ткани (N). Черный прямоугольник – метилирование (продукт МС-ПЦР) выявлено; белый – не выявлено. Значения интенсивности полос продуктов ОТ-ПЦР гена *miR-9-1* нормировали по интенсивности полос продукта ОТ-ПЦР контрольного гена *B2M*. Приведены данные для 34 парных образцов НМРЛ. При расчете корреляции по Спирману за совпадения принимали: а) потерю метилирования гена *miR-9-1* в ДНК опухоли при повышении уровня его экспрессии; б) появление метилирования гена *miR-9-1* в ДНК опухоли при снижении уровня экспрессии гена.

Образец, №	<i>miR-9-1</i>		
	T	N	Exp
5		■	50
12		■	10
57		■	10
130		■	10
119			1
80			1
82			1
13			1
44			1
40		■	1
55			1
68			1
74			1
76	■	■	1
83			1
59			1
134		■	1
155			1
35	■		0.2
111	■		0.1
75	■		0.1
47	■		0.1
79	■		0.1
63	■		0.1
69	■		0.1
66	■		0.1
65	■		0.05
86	■		0.05
91	■		0.05
110	■		0.02
77	■		0.02
41	■		0.01
46	■		0.01
72	■		0.01
$R_s = 0.95$	$P = 4.5 \times 10^{-12}$		
$t = 13.92$			

(табл. 3). При помощи непараметрической статистики установлена высоко значимая отрицательная корреляция между изменениями уровней экспрессии *miR-9-1* и *RAR-beta2*, *miR-17* и *RAR-beta2*, а также *miR-17* и *NKIRAS1* ($P \approx 3 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-13}$ по Спирману) при НМРЛ. Так, из 16 образцов, в которых снижено содержание при-микроРНК *miR-9-1*, уровень мРНК *RAR-beta2* был повышен в восьми (в 5 или более раз), а в одном (образец 130) 10-кратное снижение количества мРНК *RAR-beta2* сочеталось с 10-кратным повышением содержания при-микроРНК *miR-9-1*. Из 15 образцов со сниженным (в 5 или более раз) содержанием при-микроРНК *miR-17* в 11 наблюдалось увеличение (в 5 или более раз) количества мРНК *RAR-beta2* и в восьми повышении (в 10 или более раз) количества мРНК *NKIRAS1* (табл. 3).

Таким образом, установлена обратная зависимость между уровнями экспрессии гена микроРНК *miR-17* и потенциальных генов-мишеней *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, а также между уровнями экспрессии микроРНК *miR-9-1* и ее потенциального гена-мишени *RAR-beta2*.

Статус метилирования группы генов микроРНК и изменение уровней экспрессии генов *RAR-beta2* и *NKIRAS1*

Мы сопоставили изменения уровней экспрессии генов *RAR-beta2* и *NKIRAS1* в первичных опухолях легкого с изменениями статуса метилирования группы генов микроРНК (*miR-193a*, *miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*), предположительно участвующих в регуляции активности генов *RAR-beta2* и *NKIRAS1* (рис. 3а,б). При помощи непараметрической статистики установлено существование значимой корреляции между изменением содержания мРНК *NKIRAS1* и статуса метилирования *miR-193a* и *miR-34b/c* ($P \approx 4 \times 10^{-13}$; $P \approx 3 \times 10^{-10}$ по Спирману, рис. 3а), а также между изменением содержания мРНК *RAR-beta2* и статуса метилирования *miR-193a*, *miR-9-1*, *miR-9-3* и *miR-34b/c* ($P \approx 10^{-10} - 10^{-12}$ по Спирману, рис. 3б).

а Образец, №	<i>NKIRAS1</i>	<i>miR-193a</i>		<i>miR-34b/c</i>		б Образец, №	<i>RAR-beta2</i>	<i>miR-193a</i>		<i>miR-9-1</i>		<i>miR-9-3</i>		<i>miR-34b/c</i>	
	Exp	T	N	T	N		Exp	T	N	T	N	T	N	T	N
155	5000	■	□	■	□	91	1000	□	□	■	□	□	□	■	□
47	500	■	■	■	□	77	500	■	□	■	□	■	□	■	□
91	500	□	□	■	□	59	500	□	□	□	□	□	□	□	□
44	200	■	□	■	□	47	200	■	■	■	□	■	□	■	□
57	100	■	□	■	□	74	200	■	■	■	■	□	□	■	□
75	50	■	■	■	□	82	100	■	□	□	□	■	■	□	□
40	50	■	■	■	□	79	100	■	■	■	□	□	□	■	□
74	50	■	■	■	□	57	100	■	□	□	■	■	■	■	□
76	50	■	■	■	■	66	70	□	□	■	□	□	□	□	■
35	20	□	□	□	□	40	50	■	■	□	■	■	■	■	□
55	20	□	□	■	□	76	50	■	■	■	■	□	□	■	■
77	20	■	□	■	□	80	20	□	□	□	□	■	□	□	□
69	20	□	□	■	□	75	20	■	■	■	□	■	■	■	□
5	10	□	■	□	■	44	20	□	□	□	□	□	□	□	□
82	10	■	□	□	□	83	20	■	■	□	□	■	■	□	■
12	10	□	□	□	■	119	10	■	□	□	□	□	■	■	□
46	10	□	□	□	□	69	5	□	□	■	□	■	□	■	□
79	10	■	■	■	□	86	5	□	□	□	□	■	□	■	□
66	10	□	□	□	■	110	1	■	□	■	□	■	■	■	□
83	10	■	■	□	■	111	1	■	□	□	□	■	■	□	■
119	2	■	□	■	□	35	1	□	□	■	□	■	□	□	□
110	1	■	□	■	□	65	1	□	□	■	□	■	□	■	□
111	1	■	□	□	■	5	1	□	■	□	■	□	□	□	■
65	1	□	□	■	□	13	1	□	■	□	□	■	■	□	□
80	1	□	□	□	□	12	1	□	□	□	■	■	■	□	■
13	1	□	■	□	□	41	1	□	□	■	□	■	□	■	■
41	1	□	□	■	■	55	1	□	□	□	□	■	□	■	□
72	1	■	■	■	□	72	1	■	■	■	□	■	□	■	□
68	1	□	□	□	□	68	1	□	□	□	□	□	□	□	□
63	1	■	□	■	□	63	1	■	□	■	□	■	■	■	□
59	1	□	□	□	□	155	1	■	□	□	□	□	□	■	□
86	0.33	□	□	■	□	134	0.2	□	■	□	■	□	□	□	■
134	0.005	□	■	□	■	130	0.1	□	□	□	■	□	□	■	□
130	0.001	□	□	■	□	46	0.02	□	□	■	□	□	■	□	□
		$R_s = 0.93$ $t = 13.3$ $P = 4.12 \times 10^{-13}$		$R_s = 0.93$ $t = 13.3$ $P = 4.12 \times 10^{-13}$				$R_s = 0.92$ $t = 11.85$ $P = 5.53 \times 10^{-12}$		$R_s = 0.91$ $t = 11.77$ $P = 2.36 \times 10^{-12}$		$R_s = 0.88$ $t = 10.55$ $P = 8.73 \times 10^{-12}$		$R_s = 0.88$ $t = 9.86$ $P = 8.99 \times 10^{-11}$	

Рис. 3. Статус метилирования генов ряда микроРНК (*miR-193a*, *miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*) и соотношение уровней экспрессии (Exp, количество мРНК) генов *NKIRAS1* (а) и *RAR-beta2* (б) в образцах опухолей (Т) и прилежащей гистологически нормальной ткани (N) легкого. Черный прямоугольник – метилирование (продукт МС-ПЦР) выявлено; белый – не выявлено. Значения интенсивностей полос продуктов ОТ-ПЦР генов *NKIRAS1* и *RAR-beta2* нормировали относительно интенсивностей полос продукта ОТ-ПЦР контрольного гена *B2M*. Приведены данные для 34 парных образцов НМРЛ. При расчете корреляции по Спирману за совпадения принимали а) потерю метилирования гена микроРНК в ДНК опухоли при снижении уровня экспрессии потенциального гена-мишени; б) появление метилирования гена микроРНК в ДНК опухоли при повышении уровня экспрессии гена-мишени.

Таблица 3. Корреляция между изменением содержания при-микроРНК *miR-9-1* и *miR-17* и мРНК *RAR-beta2* и *NKIRAS1* в образцах опухолей легкого по отношению к норме

Образец, №	<i>miR-9-1</i>	<i>RAR-beta2</i>	Образец, №	<i>miR-17</i>	<i>RAR-beta2</i>	<i>NKIRAS1</i>
5	50	1	35	100	1	20
12	10	1	5	100	1	10
57	10	100	80	100	20	1
130	10	0.1	65	10	1	1
119	1	10	75	10	20	50
80	1	20	12	10	1	10
82	1	100	57	5	100	100
13	1	1	110	1	1	1
44	1	20	13	1	1	1
40	1	50	46	1	0.02	10
55	1	1	47	1	200	500
68	1	1	55	1	1	20
74	1	200	76	1	50	50
76	1	50	83	1	20	10
83	1	20	86	1	5	0.33
59	1	500	91	1	1000	500
134	1	0.2	134	1	0.2	0.005
155	1	1	130	1	0.1	0.001
35	0.2	1	155	1	1	5000
111	0.1	1	40	0.2	50	50
75	0.1	20	119	0.1	10	2
47	0.1	200	82	0.1	100	10
79	0.1	100	79	0.1	100	10
63	0.1	1	69	0.1	5	20
69	0.1	5	66	0.1	70	10
66	0.1	70	59	0.1	500	1
65	0.05	1	111	0.05	1	1
86	0.05	5	44	0.02	20	200
91	0.05	1000	68	0.02	1	1
110	0.02	1	72	0.01	10	1
77	0.02	500	77	0.01	500	20
41	0.01	1	74	0.01	200	50
46	0.01	0.02	41	0.001	1	1
72	0.01	1	63	0.0001	1	1
		$R_s = 0.92$			$R_s = 0.91$	$R_s = 0.91$
		$t = 12.61$			$t = 11.65$	$t = 11.76$
		$P = 4.56 \times 10^{-13}$			$P = 3.0 \times 10^{-12}$	$P = 1.46 \times 10^{-12}$

Примечание. При расчете корреляции по Спирману за совпадения принимали образцы, в которых наблюдалась обратная зависимость между изменениями содержания при-микроРНК и мРНК генов-мишеней. Серым помечены образцы с обратным соотношением содержания при-микроРНК и мРНК; черным полужирным выделено снижение уровня при-микроРНК и повышение уровня мРНК; полужирным на темно-сером фоне показано повышение уровня при-микроРНК и снижение уровня мРНК.

Метилирование *miR-193a* и *miR-34b/c* выявлено в 12 и 13 образцах, соответственно, из 20, в которых повышен (в 10 или более раз) уровень экспрессии *NKIRAS1* (рис. 3а). Из трех образцов, в которых была снижена экспрессия гена *NKIRAS1*, в одном выявлено деметилирование генов микроРНК *miR-193a* и *miR-34b/c*. Повышение (в 10 или более раз) уровня экспрессии гена *RAR-beta2* обнаружено в 18 образцах, а метилирование генов *miR-193a*, *miR-9-1*, *miR-9-3* и *miR-34b/c* в 12, 9, 13 и 13 из них соответственно (рис. 3б). Из трех образцов со сниженной экспрессией гена *RAR-beta2* в одном были деметилированы гены *miR-193a*, *miR-9-3* и *miR-34b/c* и в двух ген *miR-9-1*.

Таким образом, метилирование ряда генов микроРНК в опухолях легкого ассоциировано с повышенной экспрессией белоккодирующих генов *NKIRAS1* или *RAR-beta2*, а деметилирование генов этих микроРНК ассоциировано с пониженной экспрессией их потенциальных генов-мишеней. Причем в опухолях легкого чаще наблюдается метилирование генов этих микроРНК, сопряженное с повышенной экспрессией потенциальных генов-мишеней.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Роль метилирования группы генов микроРНК в развитии НМРЛ

По мнению некоторых авторов, при онкогенезе метилированию подвержено не менее 10% генов микроРНК [9]. В нашей работе показано, что метилирование группы генов микроРНК *miR-9-1*, *miR-34b/c*, *miR-9-3* и *miR-193a* характерно для НМРЛ. Высокие частоты метилирования генов *miR-9-1*, *miR-9-3* и *miR-34b/c* при НМРЛ, варьирующие в интервале 52–61%, хорошо согласуются с опубликованными данными [10, 2932]. Следует отметить, что нами впервые определена частота метилирования генов микроРНК *miR-129-2* и *miR-193a* в первичных опухолях легкого, составившая 29 и 65%, соответственно. Метилирование генов *miR-193a* и *miR-129-2* выявлено в первичных опухолях разной локализации [13, 18, 19, 3336], но данные о метилировании этих генов при НМРЛ не опубликованы.

По нашему мнению, отсутствие статистически значимых различий в уровнях метилирования генов *miR-193a* и *miR-9-3* связано с аномальной степенью их метилирования в условно нормальной ткани онкологических больных (табл. 2). Одновременное метилирование генов некоторых микроРНК в опухолевой и в условно нормальной ткани легкого можно, по-видимому, объяснить тем, что молекулярные изменения при онкогенезе могут опережать морфологические нарушения как, например, в случае опухоль-ассоциированных структурных генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* [37–39].

На основании этих данных можно предположить, что метилирование генов ряда микроРНК – раннее событие в онкогенезе НМРЛ. Так, метилирование гена *miR-9-1* наблюдается как в инвазивных протоковых опухолях молочной железы, так и в преинвазивных внутрипротоковых новообразованиях [40].

Кроме частых случаев метилирования генов ряда микроРНК при НМРЛ, нами выявлена сравнительно частая потеря метилирования в опухоли с сохранением метилирования в условно нормальной ткани легкого. Наиболее часто деметилированию подвергаются *miR-34b/c* (16%), *miR-9-3* (23%) и *miR-129-2* (20%), причем потеря метилирования генов *miR-9-3* и *miR-34b/c* чаще происходит на более поздних стадиях заболевания, что согласуется с представлениями о связи полного деметилирования с прогрессией опухолей [28].

В нашей работе установлена статистически значимая корреляция между изменением содержания при-микроРНК гена *miR-9-1* и статусом метилирования CpG-островка этого гена в первичных опухолях легкого (рис. 2), что указывает на возможность эпигенетической регуляции этого гена при НМРЛ. Данные о корреляции между изменениями уровня экспрессии и статуса метилирования гена *miR-9-1* в первичных опухолях легкого не опубликованы. Однако получены сведения об эпигенетической инактивации гена *miR-34b/c* при раке легкого [32, 41] и в опухоли другой локализации [42–44]. Показано, что метилирование вовлечено в подавление экспрессии генов *miR-9-1*, *miR-9-3* в опухолях ротовой полости, желудка, почки, толстой кишки и молочной железы [19, 40, 45–47]. Роль метилирования в регуляции экспрессии *miR-129-2* ранее изучали в опухолях другой локализации [19, 33, 48].

Роль микроРНК (*miR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-17*, *-193a*) в регуляции экспрессии потенциальных генов-мишеней *RAR-beta2* и *NKIRAS1*

Короткое плечо хромосомы 3 (3p), как следует из результатов цитогенетического картирования и анализа полиморфных ДНК-маркеров, в опухолях легкого и почки подвергается делеции с большей частотой, чем другие районы генома человека [49]. К настоящему времени на 3p локализован ряд критических районов, содержащих кластеры генов-супрессоров и онкогенов [50–52]. Показано, что экспрессия ряда генов, расположенных на 3p, регулируется эпигенетически, так экспрессия генов-супрессоров *RASSF1A* и *SEMA3B* подавляется при метилировании, а протоонкоген *RHOA* активируется при потере метилирования [17, 38, 53, 54]. Вызывает интерес и роль микроРНК в регуляции экспрессии генов 3p, например *RAR-beta2* и *NKIRAS1*, активность которых может изменяться как при метилировании [39, 55], так и под дей-

ствием микроРНК. Ген *RAR-beta2* входит в число предполагаемых мишеней *miR-193a*, *miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c* и *miR-17*, а ген *NKIRAS1* – мишеней *miR-193a*, *miR-34b/c* и *miR-17* (TargetScan, <http://www.targetscan.org/>, Release 6.0, November 2011).

Нами выявлена значимая отрицательная корреляция ($P \approx 3 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-13}$ по Спирману) между изменениями уровней экспрессии *miR-9-1* и *miR-17* и гена-мишени *RAR-beta2*, а также *miR-17* и *NKIRAS1* при НМРЛ (34 образца). Обратная зависимость между уровнями экспрессии генов микроРНК и их генов-мишеней согласуется с известным механизмом подавления экспрессии белоккодирующих генов под действием микроРНК [4, 33, 56]. Эти результаты также свидетельствуют в пользу биоинформатических данных, согласно которым мРНК гена *RAR-beta2* является мишенью микроРНК *miR-17* и *miR-9-1*, а мРНК гена *NKIRAS1* – микроРНК *miR-17*.

Впервые определены значимые корреляции ($P \approx 3 \times 10^{-10} - 4 \times 10^{-13}$ по Спирману) между изменениями статуса метилирования группы генов микроРНК (*miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*, *miR-193a*) и уровня экспрессии *RAR-beta2*, а также между изменениями метилирования генов *miR-34b/c* и *miR-193a* и уровня экспрессии *NKIRAS1* в первичных опухолях легкого. Эти результаты указывают на возможность опосредованного влияния метилирования генов ряда микроРНК на изменение экспрессии генов-мишеней. Полученные данные согласуются с обратной зависимостью между уровнями экспрессии генов *RAR-beta2* и *NKIRAS1* и генов микроРНК, показанной нами на примере генов *miR-9-1* и *miR-17*. Эти результаты также свидетельствуют в пользу биоинформатических данных о том, что мРНК гена *RAR-beta2* служит мишенью для микроРНК *miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*, *miR-193a*, а мРНК *NKIRAS1* – микроРНК *miR-34b/c* и *miR-193a*.

Наши результаты указывают на возможность опосредованного влияния метилирования генов микроРНК *miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c* и *miR-193a* на изменение экспрессии генов-мишеней *NKIRAS1* или *RARbeta2*. Метилирование генов микроРНК при НМРЛ может приводить к понижению уровней их экспрессии и, как следствие, к снятию негативного влияния микроРНК на экспрессию генов-мишеней.

Существование гомологии между *NKIRAS1* и онкогеном *RAS1*, деметилирование гена *NKIRAS1* при НМРЛ [55], а также повышение уровня экспрессии генов *RAR-beta2* и *NKIRAS1* при НМРЛ (результаты нашей работы) позволяют говорить о том, что гены *RAR-beta2* и *NKIRAS1* могут выполнять функцию онкогенов при НМРЛ.

Интересно, что в число мишеней рассмотренных микроРНК часто входят мРНК типичных он-

когенных белков. Так, к мишеням микроРНК *miR-9* относится мРНК онкогена *NFKB1* [4]. Мишенями *miR-34b/c* служат мРНК онкогенных белков – МЫС, CDK4, CDK6, E2F3, CREB и MET [4, 57], а введение предшественника зрелой микроРНК *miR-34b/c* в линии опухолевых клеток приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Мишенями *miR-193a* являются известные онкогены *K-ras* и *c-kit* [13, 36, 58]. Так, трансфекция синтетической *miR-193a* приводит к угнетению клеточного роста и снижению экспрессии онкогена *c-kit* в культурах клеток лимфолейкоза и опухолей ротовой полости [13, 36].

Таким образом, изученные нами гены микроРНК гиперметилированы при НМРЛ и могут быть отнесены к потенциальным супрессорам опухолевого роста, способным подавлять экспрессию онкогенов, мРНК которых служат их мишенями.

Полученные в нашей работе данные могут использоваться для создания новых маркеров для диагностики НМРЛ.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-01213-а, 11-04-00269) и Минобрнауки РФ в рамках Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (ГК 16.740.11.0173). Работа также выполнена с использованием оборудования ЦКП ФГУП “ГосНИИгенетика” при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 16.552.11.7029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. **120**, 15–20.
2. Bartel D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. **136**, 215–233.
3. Janga S.C., Vallabhaneni S. 2011. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks. *Adv. Exp. Med. Biol.* **722**, 59–74.
4. Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S.J., Shimizu K. 2011. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* **278**, 1598–1609.
5. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. 2006. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **6**, 259–269.
6. Lee S.K., Calin G.A. 2011. Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov. Med.* **11**, 245–254.
7. Farazi T.A., Spitzer J.I., Morozov P., Tuschl T. 2011. miRNAs in human cancer. *J. Pathol.* **223**, 102–115.
8. Munker R., Calin G.A. 2011. MicroRNA profiling in cancer. *Clin. Sci. (Lond.)*. **121**, 141–158.
9. Han L., Witmer P.D., Casey E., Valle D., Sukumar S. 2007. DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 1284–1288.

10. 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., Esteller M. 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 13556–13561.
11. Rodriguez-Otero P., Román-Gómez J., Vilas-Zornoza A., José-Eneriz E.S., Martín-Palanco V., Rifón J., Torres A., Calasanz M.J., Agirre X., Prosper F. 2011. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. *Br. J. Haematol.* **155**, 73–83.
12. Rotkrua P., Akiyama Y., Hashimoto Y., Otsubo T., Yuasa Y. 2011. MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. *Int. J. Cancer*. **129**, 2611–2620.
13. Gao X.N., Lin J., Li Y.H., Gao L., Wang X.R., Wang W., Kang H.Y., Yan G.T., Wang L.L., 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.
14. UICC TNM classification of malignant tumors. 6th edn. 2002. Eds Sobin L.Y., Wittekind Ch. Wiley-Liss INC Publ.
15. Travis W.D., Coby T.V., Corrin B., Shimosato Y., Brambilla E. 1999. World Health Organization International Histological Classification of Tumours; histological typing of lung and pleural tumours, 3rd edn. Berlin: Springer.
16. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 9821–9826.
17. Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Малюкова А.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. 2009. Два CpG-островка гена *SEMA3B*: метилирование при светлоклеточном раке почки. *Молекуляр. биология*. **43**(6), 1088–1092.
18. Ando T., Yoshida T., Enomoto S., Asada K., Tatematsu M., Ichinose M., Sugiyama T., Ushijima T. 2009. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int. J. Cancer*. **124**, 2367–2374.
19. Bandres E., Agirre X., Bitarte N., Ramirez N., Zarate R., Roman-Gomez J., Prosper F., Garcia-Foncillas J. 2009. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. **125**, 2737–2743.
20. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
21. 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. *Молекуляр. биология*. **43**, 439–445.
22. Lee E.J., Gusev Y., Jiang J., Nuovo G.J., Lerner M.R., Frankel W.L., Morgan D.L., Postier R.G., Brackett D.J., Schmittgen T.D. 2006. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*. **120**, 1046–1054.
23. Schmittgen T.D., Lee E.J., Jiang J., Sarkar A., Yang L., Elton T.S., Chen C. 2008. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*. **44**, 31–38.
24. 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., 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 Chromosomes Cancer*. **45**, 676–691.
25. Glenn S.T., Jones C.A., Liang P., Kaushik D., Gross K.W., Kim H.L. 2007. Expression profiling of archival renal tumors by quantitative PCR to validate prognostic markers. *Biotechniques*. **43**, 639–640.
26. Yang Q., Yoshimura G., Sakurai T., Nakamura M., Nakamura Y., Shan L., Suzuma T., Tamaki T., Umemura T., Mori I. and Kakudo K. 2001. Allelic loss of chromosome 3p24 correlates with tumor progression rather than with retinoic acid receptor β 2 expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treatment*. **70**, 39–45.
27. Selcuklu S.D., Yakicier M.C., Erson A.E. 2009. An investigation of microRNAs mapping to breast cancer related genomic gain and loss regions. *Cancer Genet. Cytogenet.* **189**, 15–23.
28. Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. 2007. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1775**, 138–162.
29. Lujambio A., Ropero S., Ballestar E., Fraga M.F., Cerato C., Setién F., Casado S., Suarez-Gauthier A., Sanchez-Cespedes M., Gitt A., Spiteri I., Das P.P., Caldas C., Miska E., Esteller M. 2007. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*. **67**, 1424–1429.
30. Kitano K., Watanabe K., Emoto N., Kage H., Hamano E., Nagase T., Sano A., Murakawa T., Nakajima J., Goto A., Fukayama M., Yatomi Y., Ohishi N., Takai D. 2011. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. **102**, 2126–2131.
31. Wang Z., Chen Z., Gao Y., Li N., Li B., Tan F., Tan X., Lu N., Sun Y., Sun J., Sun N., He J. 2011. DNA hypermethylation of microRNA-34b/c has prognostic value for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 490–496.
32. Watanabe K., Emoto N., Hamano E., Sunohara M., Kawakami M., Kage H., Kitano K., Nakajima J., Goto A., Fukayama M., Nagase T., Yatomi Y., Ohishi N., Takai D. 2012. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. **130**, 2580–2590.
33. Huang Y.W., Liu J.C., Deatherage D.E., Luo J., Mutch D.G., Goodfellow P.J., Miller D.S., Huang T.H. 2009. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer Res*. **69**, 9038–9046.
34. Shen R., Pan S., Qi S., Lin X., Cheng S. 2010. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 in gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 1047–1052.

35. Chen X., Hu H., Guan X., Xiong G., Wang Y., Wang K., Li J., Xu X., Yang K., Bai Y. 2012. CpG island methylation status of miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. **130**, 1607–1613.
36. Kozaki K., Imoto I., Mogi S., Omura K., Inazawa J. 2008. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*. **68**, 2094–2105.
37. Логинов В.И., Малюкова А.В., Серегин Ю.А., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. 2004. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников. *Молекуляр. биология*. **38**, 654–667.
38. 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., Zabarovsky 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.
39. Ходырев Д.С., Логинов В.И., Пронина И.В., Казубская Т.П., Гарькавцева Р.Ф., Брага Э.А. 2008. Метилирование промоторной области гена *RARB-beta2* в опухолях почки, молочной железы и яичников. *Генетика*. **44**, 1126–1132.
40. Lehmann U., Hasemeier B., Christgen M., Muller M., Romermann D., Langer F., Kreipe H. 2008. Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *J. Pathol*. **214**, 17–24.
41. Tanaka N., Toyooka S., Soh J., Kubo T., Yamamoto H., Maki Y., Muraoka T., Shien K., Furukawa M., Ueno T., Asano H., Tsukuda K., Aoe K., Miyoshi S. 2012. Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. **76**, 32–38.
42. Toyota M., Suzuki H., Sasaki Y., Maruyama R. 2008. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*. **68**, 4123–4132.
43. Suzuki H., Yamamoto E., Nojima M. 2010. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis*. **31**, 2066–2073.
44. Tsai K.W., Wu C.W., Hu L.Y., Li S.C., Liao Y.L., Lai C.H., Kao H.W., Fang W.L., Huang K.H., Chan W.C., Lin W.C. 2011. Epigenetic regulation of *miR-34b* and *miR-129* expression in gastric cancer. *Int. J. Cancer*. **129**, 2600–2610.
45. Tsai K.W., Liao Y.L., Wu C.W., Hu L.Y., Li S.C., Chan W.C., Ho M.R., Lai C.H., Kao H.W., Fang W.L., Huang K.H., Lin W.C. 2011. Aberrant hypermethylation of *miR-9* genes in gastric cancer. *Epigenetics*. **6**, 1189–1197.
46. Minor J., Wang X., Zhang F., Song J., Lu X., Gross N., Wang D., Lu S.L. 2012. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. **48**, 73–78.
47. Hildebrandt M.A., Gu J., Lin J., Ye Y., Tan W., Tamboli P., Wood C.G., Wu X. 2010. *Hsa-miR-9* methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. **29**, 5724–5728.
48. Lopes-Serra P., Esteller M. 2012. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene*. **31**, 1609–1622.
49. Брага Э.А., Кашуба В.И., Малюкова А.В., Логинов В.И., Сенченко В.Н., Базов И.В., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. 2003. Новые гены-супрессоры опухолевого роста в горячих точках хромосомы 3 человека: новые методы идентификации. *Молекуляр. биология*. **37**, 194–211.
50. Логинов В.И., Базов И.В., 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.
51. Zabarovsky E.R., Senchenko V., Loginov V., Pavlova T., Zabarovska V., Dmitriev A., Lung M., Panda C.K., Kashuba V., Lerman M.I., Braga E.A. 2011. Positional cloning of tumor suppressor genes from 3p21.3 involved in major human cancers. *Horizons in Cancer Res*. **42**, 103–127.
52. 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., Zabarovsky E.R. 2011. A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes. *Exp. Oncol*. **33**, 33–41.
53. 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. *Молекуляр. биология*. **40**, 865–877.
54. Zabarovsky E.R., Braga E.A., Loginov V., Senchenko V., Kudryavtseva A., Dmitriev A., Khodyrev D., Pavlova T., Rynditch A.V., Lerman M.I., Kashuba V. 2011. Novel methylation-dependent markers/tumor suppressor genes involved in the development of renal cell cancer. *Horizons in Cancer Res*. **42**, 129–152.
55. Ходырев Д.С., Логинов В.И., Пронина И.В., Казубская Т.П., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. 2011. Изменение метилирования генов из критических районов хромосомы 3 в эпителиальных опухолях. *Молекуляр. медицина*. **1**, 3–10.
56. Bhatti I., Lee A., Lund J., Larvin M. 2009. Small RNA: a large contributor to carcinogenesis? *J. Gastrointest. Surg*. **13**, 13791388.
57. Hermeking H. 2010. The *miR-34* family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. **17**, 193–199.
58. Iliopoulos D., Rotem A., Struhl K. 2011. Inhibition of *miR-193a* expression by Max and RXR{alpha} activates *K-Ras* and *PLAU* to mediate distinct aspects of cellular transformation. *Cancer Res*. **71**, 5144–5153.