

УДК 575:599.9

Роль метилирования генов микроРНК в патогенезе первичных опухолей почки и легкого*

Логинов В.И.¹, Рыков С.В.², Береснева Е.В.², Хоконова В.В.¹, Ходырев Д.С.³,
Пронина И.В.⁴, Бурденный А.М.¹, Казубская Т.П.⁵, Брага Э.А.¹

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

² — ФГУП Государственный научный центр «ГосНИИгенетика», Москва

³ — ФГБУ Федеральный Научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва

⁴ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

⁵ — Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва

МикроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии белоккодирующих генов и вовлечены в развитие онкологических заболеваний. Одним из механизмов регуляции экспрессии генов микроРНК является метилирование CpG-островков, расположенных в их промоторных участках. Нами исследовано метилирование CpG-островков восьми генов микроРНК (MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a-1/2/3, MIR-129-2) в первичных опухолях почки и легкого с использованием представительных выборок образцов (46 случаев каждого вида) методом метилспецифичной ПЦР. Метилирование четырех генов MIR-124a-1/2/3 и MIR-129-2 в опухолях почки и гена MIR-129-2 в опухолях легкого изучено нами впервые. Показано, что при светлоклеточном почечноклеточном раке (скПКР) и немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) частота метилирования исследованных генов в образцах опухолей варьирует от 41% до 67% и значимо выше, чем в образцах гистологически нормальной ткани ($p \leq 0,05$, по Фишеру). Статистически значимое повышение частоты метилирования генов MIR-124a-3 и MIR-34b/c выявлено при НМРЛ различного гистологического типа — плоскоклеточном раке легкого (ПРЛ) и аденокарциноме (АК). При ПРЛ (в отличие от АК) установлено также значимое повышение частоты метилирования генов MIR-124a-2 и MIR-129-2, что показано впервые и может быть использовано для дифференциальной диагностики ПРЛ и АК. Выявлены корреляции частоты метилирования ряда генов микроРНК с показателями прогрессии скПКР и НМРЛ (размером опухоли, стадией, потерей дифференцировки, образованием метастазов).

Ключевые слова: гены микроРНК, метилирование, метилспецифичная ПЦР, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), светлоклеточный почечноклеточный рак (скПКР)

Введение

Ведущими локализациями в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в России являются: опухоли кожи (14%), толстой кишки (11,5%), молочной железы (11,1%) и легкого (11,0%). [1]. Рак легкого (РЛ) отличает крайне низкая пятилетняя выживаемость, что связано с поздним выявлением заболевания. Так, при обнаружении рака легкого на первой-второй стадии она составляет 57–67%, на третьей — 5–25% и на четвертой — менее 1%. Эти данные показывают актуальность изучения молекулярной генетики и выявления новых молекулярных маркеров для ранней диагностики рака легкого.

Встречаемость опухолей почки составляет всего 4%, однако наблюдается «прирост» новых случаев рака почки, а именно с 2003 г. до 2013 г. число выявленных за один год случаев увеличилось на 43% [1]. Рак почки состоит из гетерогенной группы эпителиальных опухолей, среди которых светлоклеточный почечноклеточный рак (скПКР) встречается наиболее часто и составляет 70–80% от всех опухолей почки и протекает более тяжело по сравнению с папиллярным раком почки и хромофобными опухолями. Примерно треть пациентов после резекции локализованного скПКР имеют рецидив заболевания, а поскольку химиотерапия малоприменима к скПКР, средняя выживаемость пациентов с метастазами составляет немногим

больше года [18, 35]. Приведенные сведения о распространенности и клинических особенностях скПКР показывают необходимость изучения молекулярных механизмов развития опухолей почки, что позволит идентифицировать новые молекулярно-генетические маркеры скПКР и расширить возможности диагностики, прогноза и лечения этого тяжелого заболевания.

В развитии опухолей важную роль играют микроРНК, представляющие собой короткие некодирующие РНК (19–25 н.). МикроРНК выполняют функцию посттранскрипционных регуляторов экспрессии белок-кодирующих генов, в том числе, связанных с онкогенезом, и вовлечены в процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток [20]. Открытие первой микроРНК произошло в 1993 году на модели *Caenorhabditis elegans* [25, 44]. Спустя семь лет Рейнхарт с соавторами открыли вторую микроРНК *let-7*, стимулирующую переход с поздней личиночной стадии на стадию взрослого организма [34]. Далее гомологи *let-7* были найдены в геноме человека, *Drosophila* и 11 других билатеральных животных [31]. Дальнейшие исследования выявили широкую представленность микроРНК у животных, растений и даже некоторых вирусов, а также высокую эволюционную консервативность микроРНК. К настоящему времени известно 2585 микроРНК человека (miRBase, <http://www.mirbase.org/>), каждая из которых может регу-

* Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-00829).

лизовать работу сотен генов-мишеней (TargetScan, <http://www.targetscan.org/>).

Согласно общепринятым правилам номенклатуры, названия присваиваются экспериментально выявленным и подтвержденным микроРНК до публикации сообщения об их открытии. МикроРНК, как правило, описывается с помощью префикса обозначающего происхождение, вид организма у которого она выделена, например «hsa» — это человек (*homo sapiens*), а «mmu» (*mus musculus*) — мышь. Если не указано иное, все микроРНК, упомянутые в этой статье, человеческие, и, следовательно, соответствующие видовые префиксы, были опущены. Приставка «miR-» используется для обозначения пре-микроРНК или гена, кодирующего микроРНК, а «miR-» — для обозначения зрелой формы. МикроРНК-паралогам, различающимся только одним или двумя нуклеотидами и, возможно, возникшим из-за дублирования генов предшественников, даны буквенные суффиксы (например, *MIR-34b* и *MIR-34c*). Гены микроРНК, локализованные в разных местах генома, но кодирующие микроРНК, идентичные на 100%, имеют в названии дополнительную цифру, отделенную дефисом (например, гены *MIR-124a-1*, *MIR-124a-2* и *MIR-124a-3* дают начало miR-124a) [13].

Механизмы регуляции экспрессии генов микроРНК остаются малоизученным. Одним из путей регуляции экспрессии генов микроРНК является изменение метилирования CpG-островка, прилежащего или перекрывающего ген микроРНК [14]. Более того, метилирование для генов микроРНК является более характерным эпигенетическим механизмом подавления экспрессии, чем для белок-кодирующих генов. Метилированию подвержено 11,5% (122 из 1048) генов микроРНК (по данным на 2011 г.) и только 1—2% белок-кодирующих генов [24].

Профили метилирования, как и профили экспрессии, генов микроРНК оказались высокоспецифичными для опухолей разной локализации и гистологии и широко исследуются [27, 29, 37]. Так, для немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) характерен специфичный профиль экспрессии генов микроРНК, ассоциированный с клиническими и патологическими свойствами опухоли [32]. Для

скПКР также получен ряд данных о роли микроРНК в развитии и прогрессии этого заболевания, в регуляции генов-мишеней и определены профили экспрессии группы генов микроРНК [15, 21, 33]. Так как роль гена von-Hippel-Lindeau (VHL) установлена и для семейного, и для спорадического рака почки, при изучении спектра генов микроРНК, изменяющих уровень экспрессии, в первую очередь рассматривают гены, связанные с VHL-зависимой регуляцией [30]. Исследования метилирования генов микроРНК при скПКР и НМРЛ ограничиваются отдельными публикациями и касаются, главным образом, генов семейств *MIR-9* и *MIR-34* [18, 37, 41].

Целью настоящей работы являлось изучение метилирования CpG-островков группы генов микроРНК при скПКР и НМРЛ и возможной связи этих эпигенетических изменений с прогрессией первичных опухолей почки и легкого.

Объект и методы исследования

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288).

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

Образцы первичных опухолей легкого и почки были собраны у больных и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии РОНЦ. Суммирующая информация по клиническим характеристикам образцов приведе-

Таблица 1

Суммарная характеристика 92 исследованных больных

Характеристика	Параметр	скПКР, n (%)	НМРЛ, n (%)
Общее число пациентов		46 (100)	46 (100)
Стадия заболевания	I	10 (22)	11 (24)
	II	13 (28)	19 (41)
	III	19 (41)	16 (35)
	IV	4 (9)	0 (0)
Степень дифференцировки первичной опухоли	hd	10 (22)	9 (20)
	md	19 (41)	22 (48)
	ld	17 (37)	15 (32)
Размер первичной опухоли по TNM-классификации	T ₁	16 (35)	13 (28)
	T ₂	13 (28)	20 (44)
	T ₃	14 (30)	12 (26)
	T ₄	3 (7)	1 (2)
Наличие метастазов	N ₀ M ₀	30 (65)	22 (48)
	N _{1/2} M ₁	16 (35)	24 (52)

на в табл. 1. Исследовали первичные опухоли почки и только от тех больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Все опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза (UICC, версия 2009 г.) [38] и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [10, 40]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микро-срезов (3–5 мкм), окрашенных эозином и гематоксилином. Образцы тканей хранили при –70°C. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике, как описано ранее [2]. Исследованы парные образцы опухолевой и гистологически нормальной ткани от 46 пациентов, страдающих скПКР и 46 случаев НМРЛ, включая 28 случаев с плоскоклеточным раком легкого (ПРЛ) и 18 случаев аденокарциномой (АК). Суммарно исследованы образцы опухолей от 92 пациентов.

В качестве дополнительного контроля использованы ткани легкого и почки от 10 умерших человек (в дальнейшем будут обозначены как «донор»), не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР проводили с использованием 0,5–2 мкг ДНК, как

описано ранее [2]. ДНК после обработки бисульфитом очищали, используя колонки Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 («Millipore», США). Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при –20°C и использовали в качестве матрицы при проведении метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с праймерами, приведенными в табл. 2. ПЦР проводили по программе: 95°C, 2 мин; 35 циклов {92°C, 10 с; $T_{отж}$ (табл. 1), 25 с; 72°C, 25 с}; 72°C, 3 мин на амплификаторе T-100 («Bio-Rad», США). Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта МС-ПЦР на неконвертированной ДНК. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали ДНК клеточной линии L-68. В качестве положительного контроля 100%-ного метилирования использовали ДНК клеточной линии L-68, обработанную метилтрансферазой SssI («СибЭнзим», Россия). Продукты МС-ПЦР разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле либо в 10%-ном полиакриламидном геле. Метилирование учитывали для образцов, в которых показан сигнал в УФ-свете на уровне полосы маркера массой 7 нг/мкл в трех независимых опытах.

Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0,05. Рассматривали также результаты статистически маргинально значимые ($0,05 < p < 0,1$), что соответ-

Таблица 2

Праймеры и условия МС-ПЦР

Ген	Структура праймеров (5'-3')*	Тотж, °C	Размер продукта, п.н.	Ссылка
mir-9-1	MF: TTTTATTTTCGTTGACGGGC MR: CCCGCCTCCTAACTACTATCG	52	120	[27]
	UF: TTTTTTATTTTTGTTGATGGGT UR: CCCACCTCCTAACTACTATCACC	55	120	
mir-9-3	MF: GGTGTTAGGACGTACGGAAC MR: TACCCGAATCCTAAAACGC	54	180	[27]
	UF: GGTGTTAGGATGTATGGAAT UR: TACCCAAATCCTAAAACAC	54	170	
mir-34b/c**	MF: TTTAGTTACGCGTGTGTGC MR: ACTACAACCTCCGAACGATC	57	189	[27]
	UF: TGGTTTAGTTATGTGTGTTGTGT UR: CAACTACAACCTCCCAACAATCC	57	190	
mir-124a-1	MF: AGAGTTTTTGAAGACGTCG MR: AAAAAAATAAAAAACGACGC	56,2	155	[4]
	UF: AATAAAGAGTTTTTGAAGATGTT UR: CAAAAAATAAAAAACAACAC	56,2	166	
mir-124a-2	MF: GGTTTATGTATGTTTTTAGGCG MR: TCCGTAAAAATATAACGATAG	49,1	93	[4]
	UF: TAGGTTTATGTATGTTTTTAGGTG UR: СТАТТССАТАААААТААААСААТАСА	49,1	99	
mir-124a-3	MF: GATAGTATAGTCGGTTGAGCGTAGC MR: CCTCAAAACTAAAACGAACGACG	52	152	[4]
	UF: TAGTTGGTTGAGTGTAGTGTTTTTG UR: CAAAACATAAAACAACAACAACATC	52	142	
mir-129-2	MF: GATTTTAGTTCGTATTAATGAGTTGGCGGTTTC MR: AACCCCGACTACAAAATCGCG	54	190	[6]
	UF: TGATTTTAGTTGTATTAATGAGTTGGTGGTTTTG UR: ACCAACCCCAACTACAAAATCACA	54	194	

Примечание. * m, methylated — специфичный к метилированному аллелю; u, unmethylated — специфичный к неметилированному аллелю; ** у этих микроРНК, промоторный CpG-островок общий

вует доверительному интервалу 94% (в отличие от стандартного доверительного интервала 95% при $p = 0,05$). Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных Statistica 6.1 RUS.

Результаты

Частоты метилирования восьми генов микроРНК при скПКР и НМРЛ

Метилирование CpG-островков восьми генов микроРНК (MIR-129-2, MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a-1/2/3) было изучено у 92 пациентов со злокачественными новообразованиями почки (46 случаев скПКР) и легкого (46 случаев НМРЛ) методом МС-ПЦР. На рис. 1 приведены примеры анализа продуктов МС-ПЦР пяти генов MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-34b/c, MIR-129-2 в парных (опухоль/норма) образцах скПКР и НМРЛ. Как видно на рис. 1, в ряде образцов опухолей и в некоторых образцах условной нормы выявлены продукты МС-ПЦР с праймерами на метилированные аллели и во всех образцах и опухолей, и нормы выявлены продукты МС-ПЦР с праймерами на неметилированные аллели.

При этом полностью отсутствует продукт МС-ПЦР с праймерами на метилированные аллели в контрольной ДНК клеточной линии L-68 и с праймерами на неметилированные аллели в ДНК клеточной линии L-68, искусственно метилированной с помощью метилтрансферазы SssI (в соответствии с протоколом производителя, фирмы СибЭнзимы, Россия).

Эти данные свидетельствуют о полноте бисульфитной конверсии ДНК.

На рис. 2 представлены частоты встречаемости случаев с изменением метилирования восьми генов микроРНК (MIR-129-2, MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a-1/2/3) в образцах ДНК опухолей по сравнению с образцами гистологически нормальной ткани больных при скПКР и НМРЛ и его гистологических подтипах ПРЛ и АК. Для всех исследованных генов в образцах НМРЛ и скПКР показано значимое ($p \leq 0,05$, по Фишеру) увеличение частоты

метилирования в опухоли относительно гистологически нормальной ткани, что указывает на связь метилирования данных генов с развитием этих видов рака (рис. 2А, Б). С этим заключением согласуется почти полное отсутствие метилирования этих генов, обнаруженное нами у условных «доноров» без онкопатологии в анамнезе (0–10%, рис. 2А, Б). На рис. 2В представлены профили метилирования восьми генов микроРНК при НМРЛ различного гистологического типа — при ПРЛ и АК. Статистически значимое ($p \leq 0,05$) повышение частоты метилирования MIR-34b/c и MIR-124a-3 и маргинально значимое повышение частоты метилирования генов MIR-9-1 и MIR-124a-1 выявлено при ПРЛ ($p = 0,0966$ и $p = 0,0683$ соответственно) и АК ($p = 0,0599$ и $p = 0,0599$ соответственно). При ПРЛ установлено также значимое ($p \leq 0,05$) повышение частоты метилирования генов MIR-129-2 и MIR-124a-2.

Сопоставление данных по метилированию генов микроРНК при скПКР с клиничко-гистологическими данными пациентов

Исследованы возможные корреляции между частотой метилирования генов и размером опухоли (T_1/T_2 & T_3/T_4), клинической стадией (I/II & III/IV), степенью дифференцировки (hd/md & ld) и метастазированием (N_0M_0 & $N_{1/2}M_1$) при скПКР и НМРЛ. Так, с переходом от ранних (I+II) к более поздним (III+IV) клиническим стадиям статистически значимо ($p \leq 0,05$, рис. 3А) увеличивается частота метилирования генов MIR-9-1, MIR-34b/c, MIR-129-2 при скПКР и генов MIR-124a-1/3 при НМРЛ ($p \leq 0,05$, рис. 3А) и маргинально значимая — для гена MIR-124a-3 при скПКР ($p = 0,0746$).

Наличие маргинально значимых результатов связано, скорее всего, с недостаточностью выборки. Для гена MIR-129-2 показана также значимая корреляция частоты метилирования с потерей дифференцировки (24%, 7/29 в высоко- и среднедифференцированных опухолях против 71%, 12/17 в низкодифференцированных опухолях, $p = 0,0045$). Статистически значимая корреляция с размером опухоли выявлена для генов MIR-9-1/3, MIR-129-2 при скПКР и генов MIR-34b/c, MIR-129-2 при НМРЛ ($p \leq 0,05$, рис. 3Б) и маргинально значимая — для гена MIR-124a-3 при скПКР ($p = 0,0678$). Из 46 использованных в данном исследовании случаев скПКР 16 случаев были осложнены наличием метастазов в регионарных лимфоузлах или в других органах. Для пяти генов микроРНК (MIR-9-1/3, MIR-34b/c и MIR-129-2) показано, что в 16 образцах с метастазами метилирование выявлено в несколько раз чаще, чем в остальных 30 случаях скПКР, причем различие статистически значимо ($p \leq 0,05$, рис. 3В).

Следует отметить, что значимые корреляции частот метилирования гена MIR-129-2 с прогрессией скПКР и генов MIR-124a-1 и MIR-124a-3 с прогрессией НМРЛ показаны нами впервые.

Обсуждение

Профили метилирования группы генов микроРНК в опухолях почки и легкого

Экспрессию генов микроРНК, как правило, оценивают по содержанию зрелой микроРНК, для которой характерна экстремально высокая стабильность, что делает

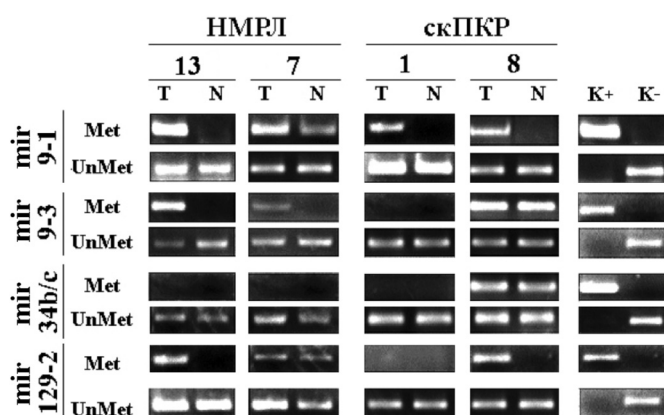


Рис. 1. Репрезентативные примеры амплификации продуктов МС-ПЦР генов микроРНК MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-34b/c, MIR-129-2 в парных (опухоль/норма — Т/Н) образцах первичных опухолей скПКР и НМРЛ. Условия МС-ПЦР и размеры продуктов приведены в табл. 1. (К+) — положительный контроль, продукты МС-ПЦР на образце ДНК клеточной линии L-68, обработанной метилтрансферазой SssI («СибЭнзим», Россия). (К-) — отрицательный контроль, продукты МС-ПЦР на образце ДНК клеточной линии L-68. Продукты МС-ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле.

этот критерий эффективным маркером [5]. Профили экспрессии генов микроРНК широко используют для молекулярной классификации опухолей разной локализации и гистологии [46], хотя выявлены многочисленные расхождения по профилям экспрессии генов микроРНК, полученным разными авторами [5]. Кроме того, следует заметить, что если микроРНК кодируется несколькими генами, например, MIR-124a-1, MIR-124a-2 и MIR-124a-3, можно оценить только тотально экспрессию всех генов данного семейства, так как продукты идентичны. В таких случаях анализ метилирования CpG-островка, перекрывающего данный ген, позволяет оценить подавление экспрессии индивидуального гена, например MIR-124a-1

или MIR-124a-3. Профили метилирования генов микроРНК опухоль-специфичны и, как и профили экспрессии, используются для молекулярной классификации опухолей разной локализации и гистологии [27, 37]. В настоящей работе исследовано метилирование восьми генов микроРНК (MIR-129-2, MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a-1/2/3) при скПКР и НМРЛ с использованием выборок по 46 образцов в каждой. Нами показано, что для профилей метилирования скПКР и НМРЛ характерно значимое повышение частоты метилирования исследованных генов микроРНК в опухолях по сравнению со значением условно нормальных тканей почки и легкого от того же пациента и практически полное отсутствие ме-

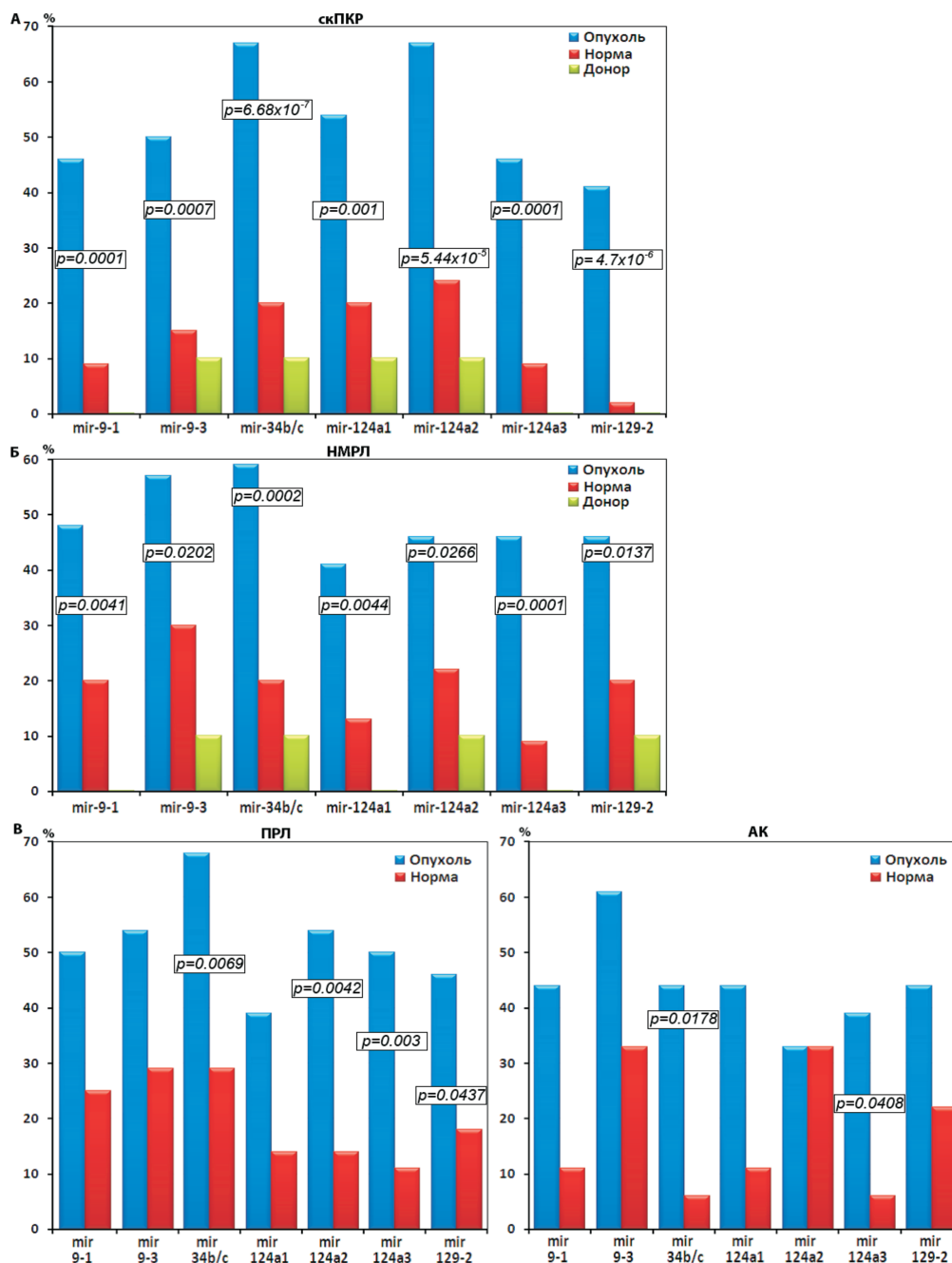


Рис. 2. Профили метилирования восьми генов микроРНК при скПКР (А), НМРЛ (Б) и его гистологических подтипах ПРЛ и АК (В). Выборки образцов включали: для А и Б по 46 парных образцов (опухоль/гистологически нормальная прилежащая ткань) скПКР и НМРЛ; В – 28 парных образцов ПРЛ и 18 парных образцов АК. На рис. А и Б приведены также данные для образцов ДНК тканей легкого и почки от скончавшихся 10 человек, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний (донор).

тирования этих генов у здоровых «доноров». Полученные результаты показывают связь появления метилирования у исследованных восьми генов микроРНК с возникновением новообразования.

Гены микроРНК семейства *mir-9* представлены в геноме в виде трех локусов: *MIR-9-1* (1q22), *MIR-9-2* (5q14.3), *MIR-9-3* (15q26.1), которые находятся во внутренних последовательностях и все содержат CpG-островки (база данных NCBI). Гены микроРНК семейства *mir-34* представлены в геноме в виде моноцистронного локуса в области 1p36.23, содержащего *MIR-34a*, и полицистронного локуса в области 11q23.1, содержащего гены *MIR-34b* и *MIR-34c*, которые экспрессируются совместно. CpG-островок генов *MIR-34b/c* соответствует CpG-островку гена-хозяина *BC021736* и перекрывает

промотор и начало первого экзона гена-хозяина. Наши результаты по частотам метилирования генов *MIR-9-1*, *-9-3* и *-34b/c* при скПКР и НМРЛ (48%, 57%, 59% и 46%, 50%, 67% соответственно) хорошо согласуются с данными других авторов [16, 18, 23, 27, 41, 43]. Тем более, что для гена *mir-34b/c* нами получены результаты для более представительной выборки образцов скПКР (46 случаев), чем в работе [41], в которой исследовано только 12 первичных опухолей почки. Метилирование четырех генов (*MIR-124a-1/2/3*, *MIR-129-2*) в опухолях почки и гена *MIR-129-2* в опухолях легкого изучено нами впервые.

МикроРНК *miR-124a* кодируется в геноме тремя локусами: *MIR-124a-1* (8p23.1), *MIR-124a-2* (8q12.3) и *MIR-124a-3* (20q13.33). Ранее для всех трех генов семейства *mir-124a* наблюдали метилирование в опухолях печени,

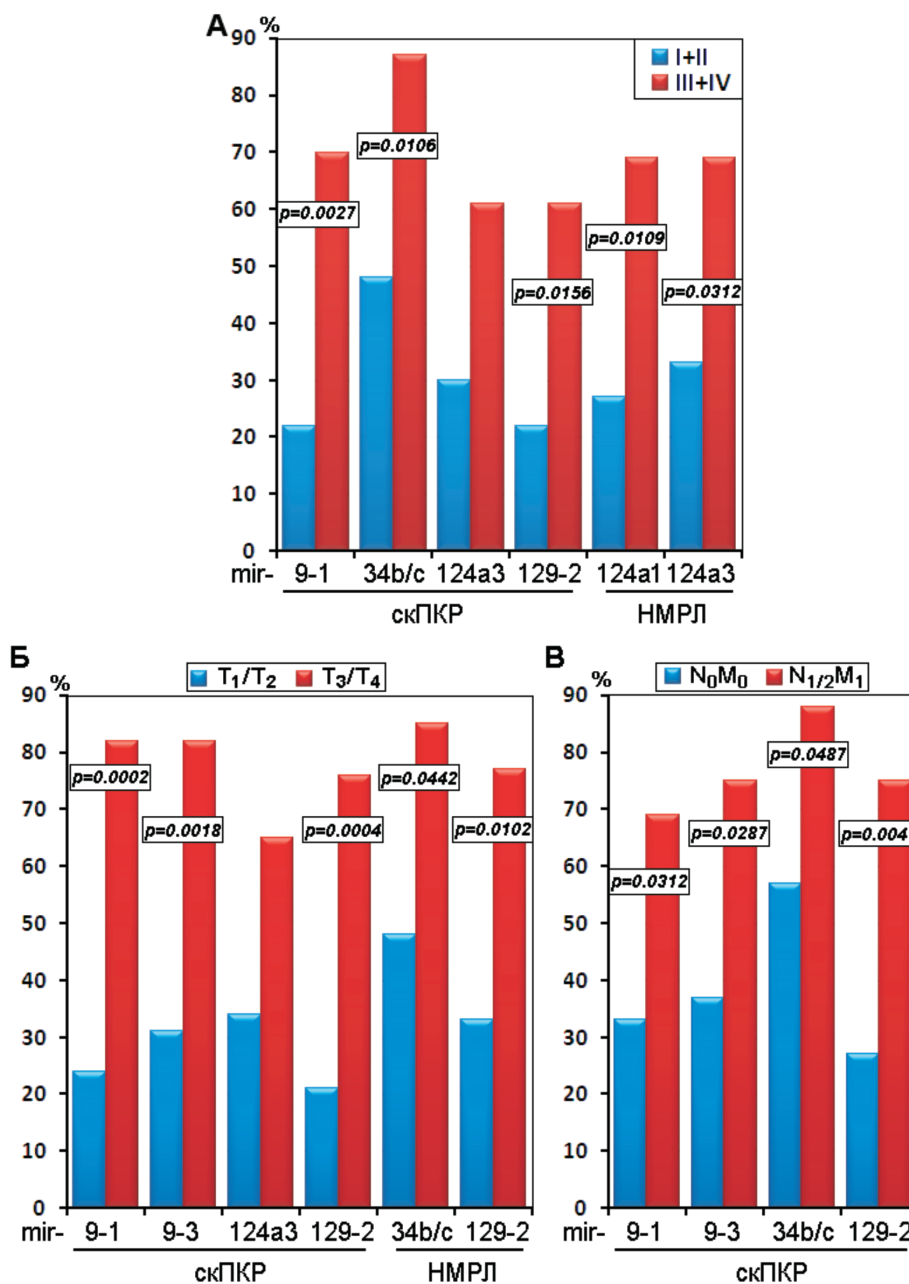


Рис. 3. Корреляция частоты метилирования 7 генов микроРНК (*MIR-129-2*, *MIR-9-1/3*, *MIR-34b/c*, *MIR-124a-1/3*) с параметрами прогрессии скПКР и НМРЛ:

А — клинической стадией (I/II & III/IV); Б — размером опухоли (T_1/T_2 & T_3/T_4); В — отсутствием или наличием метастазов в регионарных лимфоузлах или в других органах.

молочной железы и других тканей [7, 12]. Однако данные по метилированию генов этого семейства в опухолях почки в литературе отсутствуют. Нами впервые выявлено метилирование генов MIR-124a-1, MIR-124a-2 и MIR-124a-3 при скПКР с частотой 41-46%, и показано статистически значимое повышение частоты метилирования этих генов в образцах ДНК опухолей по сравнению с образцами условно нормальной ткани от тех же пациентов.

Ген микроРНК MIR-129-2 локализован в области 11p11.2. Метилирование miR-129-2 обнаружено в первичных опухолях толстого кишечника, печени и других тканях [6, 8]. Нами впервые показано статистически значимое превышение частоты метилирования этого гена в первичных опухолях почки и легкого по сравнению с условно нормальными тканями при анализе 46 парных образцов скПКР и НМРЛ.

Таким образом, в настоящей работе охарактеризован профиль метилирования восьми генов микроРНК (MIR-129-2, MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a-1/2/3) при скПКР и НМРЛ, показано значимое повышение частоты метилирования этих генов в опухолях почки и легкого, и максимальные частоты метилирования отмечены у генов MIR-34b/c (59%, скПКР) и MIR-124a-2 (67%, НМРЛ). Причем ранее в литературе не было сообщений, касающихся метилирования генов MIR-124a-1/2/3, MIR-129-2 в опухолях почки и гена miR-129-2 в опухолях легкого.

Гены микроРНК с повышенной частотой метилирования при скПКР и НМРЛ предположительно играют роль супрессоров опухолевого роста

Так как метилирование часто представляет один из критериев инактивации гена, можно предположить, что восемь генов с повышенной частотой метилирования при скПКР и НМРЛ играют роль опухолевых супрессоров.

Действительно, в опухолях микроРНК может выполняться как супрессорные функции (семейство микроРНК let-7), так и онкогенные (кластер miR-17-92) [11, 28]. Для многих генов-супрессоров опухолевого роста свойственно метилирование промоторных областей в опухолях, что ассоциировано с подавлением экспрессии гена. Высокая частота метилирования наряду с другими тестами была использована в качестве аргумента при отнесении ряда белок-кодирующих генов (например, генов RASSF1A и SEMA3B) к классу супрессоров опухолей [9, 26]. Поэтому можно предположить, что эти восемь генов микроРНК (MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a1/2/3, MIR-129-2) также выполняют функции супрессоров. С этим предположением согласуется ряд данных литературы. Так, для генов MIR-34b/c показано, что метилирование прилежащего CpG-островка ассоциировано со снижением экспрессии гена при раке толстой кишки и в других опухолях [39, 41]. Введение предшественников зрелой микроРНК miR-34b/c в линии опухолевых клеток приводит к блокированию клеточного цикла и апоптозу [39]. Интересно отметить, что промоторная область гена miR-34b/c содержит p53-узнающий мотив и поэтому ген этой микроРНК входит в индуцируемую белком p53 регуляторную сеть [17]. В линиях клеток рака толстой кишки, содержащих метилированный ген MIR-34b/c, транскрипционный фактор p53 не в состоянии восстановить экспрессию этого гена [39].

Подавление экспрессии miR-129-2 показано в различных видах рака, например при раке желудка и толстой кишки [22, 45]. Индуцированная гиперэкспрессия miR-129-2 в культуре клеток аденокарциномы легкого приводит к остановке митоза в фазе G₁/S и последующей гибели клеток [45]. Применение деметилирующих агентов вызывает восстановление экспрессии miR-129-2 и торможение роста культуры клеток опухолей толстой кишки и шейки матки [6, 19], что является прямым доказательством эпигенетической супрессии этого гена. Можно отметить, что среди мишеней рассматриваемых микроРНК в опухолях встречаются мРНК онкогенных белков. Так, к мишеням miR-34b/c относятся онкогены MYC, CDK4, E2F3, CREB и MET [17]. К мишеням miR-124a-1/2 относится онкоген CDK6, а miR-124a-3 — IQGAP1, VIM, SMYD3 [12]. Прямыми мишенями микроРНК miR-129-2 являются онкогены CDK6 и SOX4 [45]. К мишеням miR-9 относятся мРНК гена NF-каппаВ1 и онкогена CDX2, а также, по предварительным данным, полученным нами, — онкоген NKIRAS1 [3, 36, 42]. Все эти данные согласуются с предположением о супрессорной функции исследованных генов микроРНК.

Метилирование генов микроРНК связано с прогрессией скПКР и НМРЛ

В настоящей работе с использованием представительной выборки образцов (46 случаев скПКР и 46 случаев НМРЛ) установлена связь метилирования исследованных генов микроРНК с размером опухоли почки (MIR-129-2 и MIR-9-1/3) и легкого (MIR-129-2 и MIR-34b/c), с клиническими стадиями (MIR-129-2, MIR-34b/c, MIR-9-1 — скПКР и MIR-124a-1/3 — НМРЛ), с потерей дифференцировки (MIR-129-2, скПКР) и появлением метастазов в регионарных лимфоузлах или других органах (MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-129-2). Причем метилирование генов MIR-34b/c и MIR-129-2 выявляется в 88% и 75% (соответственно) случаев с метастазами. Ранее в литературе имелись данные о связи метилирования с метастазированием при скПКР и НМРЛ генов микроРНК MIR-9-1/3 и MIR-34b/c при НМРЛ [18, 23 43].

Заключение

Таким образом, в настоящей работе для семи из восьми генов (MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124f-1/3, MIR-129-2) выявлена связь частоты метилирования с какими-либо признаками опухолевой прогрессии скПКР и НМРЛ и впервые показана значимая связь с прогрессией рака почки для гена MIR-129-2, причем с четырьмя параметрами (размер опухоли, стадия, степень дифференцировки и метастазирование).

Итак, наши новые данные о гиперметилировании группы генов микроРНК при скПКР и НМРЛ, о связи метилирования этих генов с прогрессией первичных опухолей и метастазированием, а также данные литературы о подавлении их экспрессии и способности к негативной регуляции мишеней, относящихся к классу онкогенов, согласуются с предположением о супрессорной функции исследованных генов микроРНК. Кроме того, полученные в настоящей работе результаты могут найти применение при отборе новых молекулярно-генетических маркеров в диагностике скПКР и НМРЛ.

Список литературы

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России. — 250 с.
- Логинов В.И., Малукова А.В., Серегин Ю.А. и др. Уровень метилирования гена RASSF1A в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников // Молекулярная биология. — 2004. — Т. 38, № 4. — С. 654–667.
- Ходырев Д.С., Пронина И.В., Рыков С.В. и др. Метилирование группы генов микроРНК вовлечено в регуляцию экспрессии генов-мишеней RAR-beta2 и NKIRAS1 при раке легкого // Молекулярная биология. — 2012. — Т. 46. — С. 773–785.
- Ando T., Yoshida T., Enomoto S. et al. 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. — 2009. — Vol. 124, № 10. — P. 2367–2374.
- Andorfer C.A., Necela B.M., Thompson E.A., Perez E.A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer // Trends Mol. Med. — 2011. — Vol. 17, № 6. — P. 313–319.
- Bandres E., Agirre X., Bitarte N. et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer // Int. J. Cancer. — 2009. — Vol. 125, № 11. — P. 2737–2743.
- Ben Gacem R., Ben Abdelkrim O., Ziadi S. et al. Methylation of miR-124a-1, miR-124a-2, and miR-124a-3 genes correlates with aggressive and advanced breast cancer disease // Tumour Biol. — 2014. — Vol. 35, №5. — P. 4047–4056.
- Chen X., Zhang L., Zhang T. et al. Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC // Liver Int. — 2013. — Vol. 33. — P. 476–486.
- Drejlerink K., Braga E., Kuzmin I. et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98, № 13. — P. 7504–7509.
- Eble J.N., Sauter G.S., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (eds). World Health Organization: Classification of tumors. Pathology and genetics. Tumors of the urinary system and male genital organs // Lyon: IARC Press. — 2004. — P. 12–14.
- Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer // Nature Reviews Cancer. — 2006. — Vol. 6, № 4. — P. 259–269.
- Furuta M., Kozaki K.I., Tanaka S. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma // Carcinogenesis. — 2010. — Vol. 31, № 5. — P. 766–776.
- Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al. miRBase: micro-RNA sequences, targets and gene nomenclature // Nucleic Acids Res. — 2006. — Vol. 34. — D140–144.
- Han L., Witmer P.D., Casey E. et al. DNA methylation regulates microRNA expression // Cancer Biol. Ther. — 2007. — Vol. 6, № 8. — P. 1284–1288.
- Heinzelmann J., Henning B., Sanjmyatav J. et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma // World J. Urol. — 2011. — Vol. 29, № 3. — P. 367–373.
- Heller G., Weinzierl M., Noll C. et al. 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. — 2012. — Vol. 18, №6. — P. 1619–1629.
- Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis // Cell Death. Differ. — 2010. — Vol. 17, № 2. — P. 193–199.
- Hildebrandt M.A., Gu J., Lin J. et al. Has-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma // Oncogene. — 2010. — Vol. 29, № 42. — P. 5724–5728.
- Huang Y.W., Liu J.C., Deatherage D.E. et al. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer // Cancer Res. — 2009. — Vol. 69, № 23. — P. 9038–9046.
- Janga S.C., Vallabhaneni S. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks // Adv. Exp. Med. Biol. — 2011. — Vol. 722. — P. 59–74.
- Jung M., Mollenkopf H.J., Grimm C. et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy // J. Cell. Mol. Med. — 2009. — Vol. 13, № 9. — P. 3918–3928.
- Katada T., Ishiguro H., Kuwabara Y. et al. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer // Int. J. Oncol. — 2009. — Vol. 34, № 2. — P. 537–542.
- Kitano K., Watanabe K., Emoto N. et al. CpG-island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer // Cancer Sci. — 2011. — Vol. 102, №12. — P. 2126–2131.
- Kunej T., Godnic I., Ferdin J. et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature // Mutat. Res. — 2011. — Vol. 717, № 1–2. — P. 77–84.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 843–854.
- Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N. et al. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers: influence on cancer progression and angiogenesis // Plos One. — 2015. — Vol. 10, №5. — e0123369.
- Lujambio A., Calin G.A., Villanueva A. et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, №36. — P. 13556–13561.
- Lujambio A., Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer // Cell Cycle. — 2007. — Vol. 6, № 12. — P. 1455–1459.
- Munker R., Calin G.A. MicroRNA profiling in cancer // Clin. Sci. (Lond.). — 2011. — Vol. 121, №4. — P. 141–158.
- Neal C.S., Michael M.Z., Rawlings L.H. et al. The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer // BMC Medicine. — 2010. — Vol. 8. — el. 64.
- Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA // Nature. — 2000. — Vol. 408, № 6808. — P. 86–89.
- Qi J., Mu D. MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications // Front. Med. — 2012. — Vol. 6, № 2. — P. 134–155.
- Redova M., Svoboda M., Slaby O. MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2011. — Vol. 405, № 2. — P. 153–156.
- Reinhart B.J., Slack F.J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 2000. — Vol. 403, № 6772. — P. 901–906.
- Rini B.I., Campbell S.C., Escudier B. Renal cell carcinoma // Lancet. — 2009. — Vol. 373, № 9669. — P. 1119–1132.
- Rotkrup P., Akiyama Y., Hashimoto Y. et al. MiR-9 down-regulates CDX2 expression in gastric cancer cells // Int. J. Cancer. — 2011. — Vol. 129, № 11. — P. 2611–2620.
- Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S.J., Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics // FEBS J. — 2011. — Vol. 278, №10. — P. 1598–1609.
- Sobin L.H., Gospodarowicz M.K. (Mary K.); Wittekind, Ch (Christian); International Union against Cancer. 7th ed. 2009. TNM classification of malignant tumours // Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. — 310 p.
- Toyota M., Suzuki H., Sasaki Y., Maruyama R. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer // Cancer Res. — 2008. — Vol. 68, №11. — P. 4123–4132.
- Travis W., Coby T., Corrin B. et al. World Health Organization International Histological Classification of Tumours; Histological typing of lung and pleural tumours // Berlin: Springer. — 1999.
- Vogt M., Munding J., Gruner M. et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas // Virchows Arch. — 2011. — Vol. 458, № 3. — P. 313–322.
- Wan H.Y., Guo L.M., Liu T. et al. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma // Mol. Cancer. — 2010. — Vol. 9, № 16 — el.
- Watanabe K., Emoto N., Hamano E. et al. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer // Int. J. Cancer. — 2012. — Vol. 130, №11. — P. 2580–2590.
- Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-4 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 855–862.
- Wu J., Qian J., Li C. et al. miR-129 regulates cell proliferation by downregulating Cdk6 expression // Cell Cycle. — 2010. — Vol. 9, № 9. — P. 1809–1818.
- Youssef Y.M., White N.M., Grigull J. et al. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature // Eur. Urol. — 2011. — Vol. 59, № 5. — P. 721–730.

References

1. Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2013 godu (zabolevaemost' i smertnost'). — M.: FGBU «MNIIOI im. P.A. Gercena» Minzdravsocrazvitija Rossii. — 250 s.
2. Loginov V.I., Maljukova A.V., Seregin Ju.A. i dr. Uroven' metilirovaniya gena RASSF1A v jepitelial'nyh opuholjah pochki, molochnoj zhelezy i jaichnikov // Molekuljarnaja biologija. — 2004. — T. 38, № 4. — S. 654—667.
3. Hodyrev D.S., Pronina I.V., Rykov S.V. i dr. Metilirovanie gruppy genov mikroRNK vovlecheno v reguljaciju jekspresii genov-mishenej RAR-beta2 i NKIRAS1 pri rake legkogo // Molekuljarnaja biologija. — 2012. — T. 46. — S. 773—785.
4. Ando T., Yoshida T., Enomoto S. et al. 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. — 2009. — Vol. 124, № 10. — P. 2367—2374.
5. Andorfer C.A., Necela B.M., Thompson E.A., Perez E.A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer // Trends Mol. Med. — 2011. — Vol. 17, № 6. — P. 313—319.
6. Bandres E., Agirre X., Bitarte N. et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer // Int. J. Cancer. — 2009. — Vol. 125, № 11. — P. 2737—2743.
7. Ben Gacem R., Ben Abdelkrim O., Ziadi S. et al. Methylation of miR-124a-1, miR-124a-2, and miR-124a-3 genes correlates with aggressive and advanced breast cancer disease // Tumour Biol. — 2014. — Vol. 35, №5. — P. 4047—4056.
8. Chen X., Zhang L., Zhang T. et al. Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC // Liver Int. — 2013. — Vol. 33. — P. 476—486.
9. Dreijerink K., Braga E., Kuzmin I. et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98, № 13. — P. 7504—7509.
10. Eble J.N., Sauter G.S., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (eds). World Health Organization: Classification of tumors. Pathology and genetics. Tumors of the urinary system and male genital organs // Lyon: IARC Press. — 2004. — P. 12—14.
11. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer // Nature Reviews Cancer. — 2006. — Vol. 6, № 4. — P. 259—269.
12. Furuta M., Kozaki K.I., Tanaka S. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma // Carcinogenesis. — 2010. — Vol. 31, № 5. — P. 766—776.
13. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al. miRBase: micro-RNA sequences, targets and gene nomenclature // Nucleic Acids Res. — 2006. — Vol. 34. — D140—144.
14. Han L., Witmer P.D., Casey E. et al. DNA methylation regulates microRNA expression // Cancer Biol. Ther. — 2007. — Vol. 6, № 8. — P. 1284—1288.
15. Heinzelmann J., Henning B., Sanjmyatav J. et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma // World J. Urol. — 2011. — Vol. 29, № 3. — P. 367—373.
16. Heller G., Weinzierl M., Noll C. et al. 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. — 2012. — Vol. 18, №6. — P. 1619—1629.
17. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis // Cell Death. Differ. — 2010. — Vol. 17, № 2. — P. 193—199.
18. Hildebrandt M.A., Gu J., Lin J. et al. Has-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma // Oncogene. — 2010. — Vol. 29, № 42. — P. 5724—5728.
19. Huang Y.W., Liu J.C., Deatherage D.E. et al. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer // Cancer Res. — 2009. — Vol. 69, № 23. — P. 9038—9046.
20. Janga S.C., Vallabhaneni S. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks // Adv. Exp. Med. Biol. — 2011. — Vol. 722. — P. 59—74.
21. Jung M., Mollenkopf H.J., Grimm C. et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy // J. Cell. Mol. Med. — 2009. — Vol. 13, № 9. — P. 3918—3928.
22. Katada T., Ishiguro H., Kuwabara Y. et al. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer // Int. J. Oncol. — 2009. — Vol. 34, № 2. — P. 537—542.
23. Kitano K., Watanabe K., Emoto N. et al. CpG-island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer // Cancer Sci. — 2011. — Vol. 102, №12. — P. 2126—2131.
24. Kunej T., Godnic I., Ferdin J. et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature // Mutat. Res. — 2011. — Vol. 717, № 1—2. — P. 77—84.
25. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 843—854.
26. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N. et al. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers: influence on cancer progression and angiogenesis // Plos One. — 2015. — Vol. 10, №5. — e0123369.
27. Lujambio A., Calin G.A., Villanueva A. et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, №36. — P. 13556—13561.
28. Lujambio A., Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer // Cell Cycle. — 2007. — Vol. 6, № 12. — P. 1455—1459.
29. Munker R., Calin G.A. MicroRNA profiling in cancer // Clin. Sci. (Lond.). — 2011. — Vol. 121, №4. — P. 141—158.
30. Neal C.S., Michael M.Z., Rawlings L.H. et al. The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer // BMC Medicine. — 2010. — Vol. 8, — el. 64.
31. Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA // Nature. — 2000. — Vol. 408, № 6808. — P. 86—89.
32. Qi J., Mu D. MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications // Front. Med. — 2012. — Vol. 6, № 2. — P. 134—155.
33. Redova M., Svoboda M., Slaby O. MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2011. — Vol. 405, № 2. — P. 153—156.
34. Reinhart B.J., Slack F.J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 2000. — Vol. 403, № 6772. — P. 901—906.
35. Rini B.I., Campbell S.C., Escudier B. Renal cell carcinoma // Lancet. — 2009. — Vol. 373, № 9669. — P. 1119—1132.
36. Rotkrupa P., Akiyama Y., Hashimoto Y. et al. MiR-9 down-regulates CDX2 expression in gastric cancer cells // Int. J. Cancer. — 2011. — Vol. 129, № 11. — P. 2611—2620.
37. Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S.J., Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics // FEBS J. — 2011. — Vol. 278, №10. — P. 1598—1609.
38. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K. (Mary K); Wittekind, Ch (Christian); International Union against Cancer. 7th ed. 2009. TNM classification of malignant tumours // Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. — 310 p.
39. Toyota M., Suzuki H., Sasaki Y., Maruyama R. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer // Cancer Res. — 2008. — Vol. 68, №11. — P. 4123—4132.
40. Travis W., Coby T., Corrin B. et al. World Health Organization International Histological Classification of Tumours; Histological typing of lung and pleural tumours // Berlin: Springer. — 1999.
41. Vogt M., Munding J., Gruner M. et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas // Virchows Arch. — 2011. — Vol. 458, № 3. — P. 313—322.
42. Wan H.Y., Guo L.M., Liu T. et al. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma // Mol. Cancer. — 2010. — Vol. 9, № 16 — el.
43. Watanabe K., Emoto N., Hamano E. et al. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer // Int. J. Cancer. — 2012. — Vol. 130, №11. — P. 2580—2590.
44. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 855—862.
45. Wu J., Qian J., Li C. et al. miR-129 regulates cell proliferation by downregulating Cdk6 expression // Cell Cycle. — 2010. — Vol. 9, № 9. — P. 1809—1818.
46. Youssef Y.M., White N.M., Grigull J. et al. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature // Eur. Urol. — 2011. — Vol. 59, № 5. — P. 721—730.

Received 21.07.2015

Methylation of miRNA genes in the pathogenesis of primary kidney and lung tumors

**Loginov V.I.¹, Rykov S.V.², Beresneva E.V.², Hokonova V.V.¹, Hodyrev D.S.³,
Pronina I.V.⁴, Burdenny A.M.¹, Kazubskaya T.P.⁵, Braga E.A.¹**

¹ – FSBSI «Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Russia

² – Scientific Center of Russian Federation Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

³ – FSBSI «Federal Clinical Scientific Centre of special medical help types and medical technologies» FMBA of Russia, Moscow

⁴ – Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

⁵ – Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia

MicroRNAs play important role in the protein coding genes expression regulation and are involved in the development of cancer. One of the miRNA gene expression regulation mechanisms is their promoter CpG islands methylation. We investigated CpG-island methylation of eight miRNA genes (MIR-9-1/3, MIR-34b/c, MIR-124a-1/2/3, MIR-129-2) in a representative selected samples of primary kidney and lung tumors (46 cases of each type) using methylation-specific PCR. Methylation of four genes – MIR-124a-1/2/3 and MIR-129-2 in the kidney tumors and MIR-129-2 in lung tumors was studied by us for the first time. It was shown that frequency of methylation of these genes in the studied NSCLC and ccRCC tumor samples was varied from 41% to 67% and was significantly higher than in normal tissue biopsy samples ($r \leq 0.05$, Fischer). A significant increase in the frequency of methylation of MIR-124a-3 and MIR-34b/c genes observed in NSCLC was rather different in various histological types – squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (AC). A significant increase of methylation frequency of MIR-124a-2 and the MIR-129-2 genes was also found in SCC (in difference of AC), which was shown for the first time and can be used in the differential diagnosis of SCC and AK. Correlations of methylation frequencies of several miRNA genes with tumor progression of ccRCC and NSCLC (tumor size, stage, loss of differentiation, metastasis) were revealed here.

Keywords: *microRNA genes, methylation, methylation-specific PCR, non-small cell lung cancer (NSCLC), clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)*