

Лаборатория патогеномики и транскриптомики

Метилирование CpG-островков промоторных районов и взаимодействие микроРНК (миРНК) с матричными РНК генов-мишеней относится к совокупности многоуровневых механизмов регуляции экспрессии генов. Стал известен интересный феномен - эпигенетическая инактивация, ассоциированная с метилированием промоторных CpG-островков, встречается у 12% генов миРНК, что на порядок чаще, чем у генов, кодирующих белки.

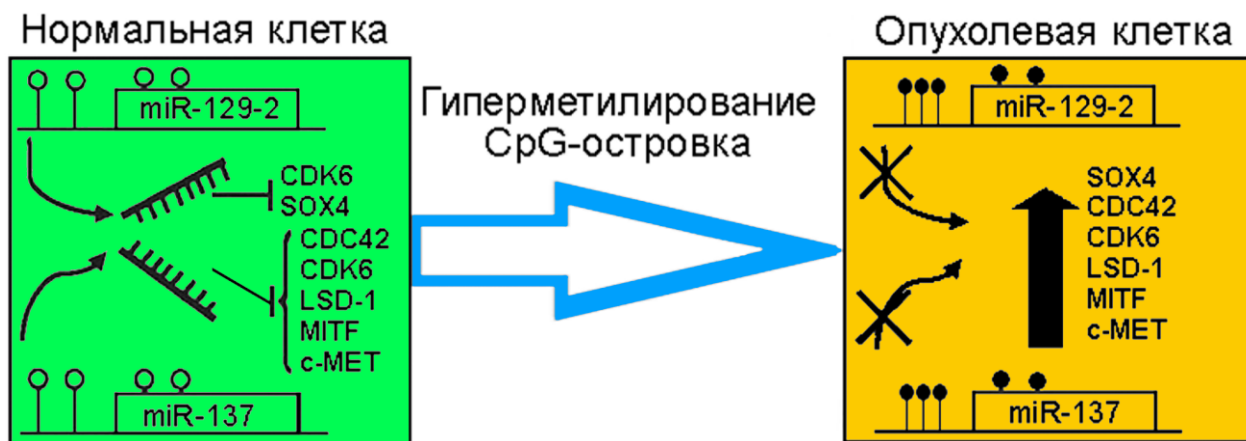


Рисунок 1. Метилирование CpG-островков вовлечено в инактивацию генов супрессорных миРНК, и опосредованно - в активацию мишеней-онкогенов и в прогрессию онкогенеза.

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

Цель работы – оценить возможность опосредованного влияния метилирования генов миРНК на активацию их генов-мишеней в опухолях легкого и почки.

Использованы общие выборки образцов немелкоклеточного рака легкого (50 случаев) и почечноклеточного рака (50 случаев). Показано, что регуляция активности ряда функционально значимых генов 3p (*RASSF1A*, *RARB2*, *SEMA3B*, *RHOA*, *NKIRAS1*, *CHL1*, *DAG1*, *USP4* и *GPX1*) ассоциирована ($P < 10^{-11}$, по Спирману) как с метилированием их CpG-островков, так и с метилированием генов миРНК, предсказанных как регуляторные по данным miRWalk.

Рисунок 2. Пример сопоставления данных по снижению (сверху вниз) уровня мРНК гена RHOA в опухолях больных НМРЛ с данными по изменению метилирования генов миРНК (miR-129-2, miR-125b-1, miR-375) в образцах опухолей (T) и прилежащей гистологически неизменной ткани (N) легкого. *Примечания.* черный прямоугольник – метилирование (продукт МС-ПЦР) выявлено, белый – не выявлено. При расчете корреляции по Спирману за совпадения принимали а) метилирование гена миРНК в ДНК опухоли при повышении уровня экспрессии потенциального гена-мишени; б) деметилирование гена миРНК в ДНК опухоли при снижении уровня экспрессии потенциального гена-мишени; в) отсутствие изменения метилирования и экспрессии.

В опухолях легкого и/или почки нами показано гиперметилирование до 14 генов миРНК (*miR-9-1/3*, *34b/c*, *212*, *193a*, *124a-1/2/3*, *129-2*, *137*, *132*, *125b-1*, *375*, *1258*).

Определены 8 новых генов миРНК, подверженных метилированию в опухолях легкого (*miR-129-2*,

137, 125b-1, 375, 1258), или почки (*miR-129-2*, 137, 124a-1/2/3). Определены гены, связанные с прогрессией и метастазированием рака легкого (*miR-125b-1* и *miR-137*) и рака почки (*miR-9-3* и *miR-129-2*). В соответствии с функциональными свойствами, в частности – инактивацией в опухолях, гиперметилируемые миРНК относят к супрессорным. Неудивительно, что среди мишеней исследованных супрессорных миРНК часто встречаются мРНК типичных онкогенных белков. Так, мишенями *mir-34b/c* являются мРНК *MYC*, *CDK4*, *CDK6*, *E2F3*, *CREB* и *MET*, а в число мишеней *mir-193a* входят известные онкогены *K-ras*, *C-kit*, *ERBB4*.

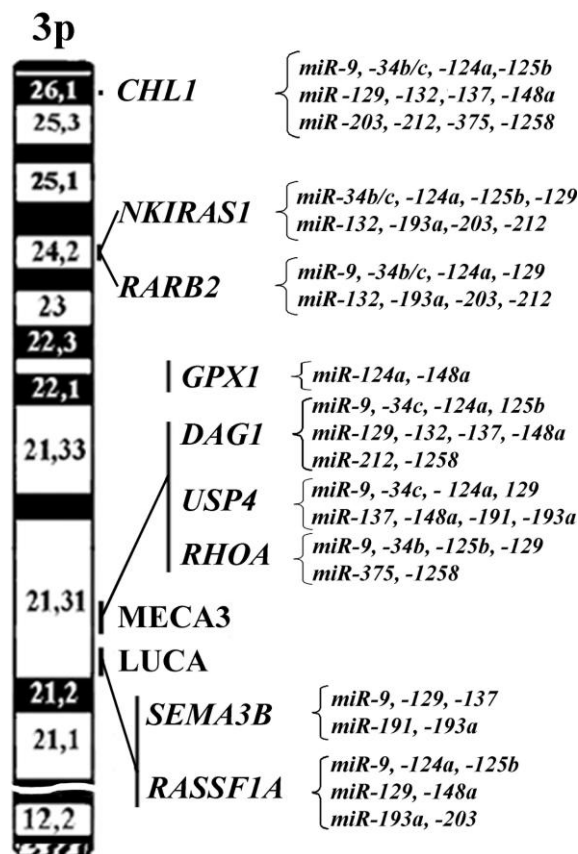


Рисунок 3. Кластеры опухоль-ассоциированных генов 3p, а также потенциально-связанные с ними гены микроРНК, - в опухолях легкого.

В результате данных исследований в опухолях легкого определены новые потенциально-регуляторные миРНК для следующих генов-мишеней:

RHOA (*miR-9-1/3*, 34b/c, 129-2, 125b-1, 375, 1258), **NKIRASI** (*miR-34b/c*, 129-2, 125b-1, 193a, 124a-1/2/3, 212, 132); **RARB2** (*miR-9-1/3*, 34b/c, 124a-1/2/3, 193a, 212, 132); **CHLI** (*miR-9-1/3*, 34b/c, 124a-1/2/3, 212, 129-2, 148a, 132, 137, 125b-1, 375, 1258) (Рис. 3).

В опухолях почки определены потенциально-регуляторные миРНК для генов-мишеней: **RASSF1A** (*miR-129-2*, 148a, 203, 193a, 124a-3, 9-1); **RARB2** (*miR-124a-3*, 132); **SEMA3B** (*miR-191*); **RHOA** (*miR-9-1/3*); **NKIRASI** (*miR-129-2*); **DAGI** (*miR-148a*, 212); **USP4** (*miR-124a-1/2/3*, 193a, 129-2, 137); **CHLI** (*miR-9-3*, 34b/c, 124a-2).

Важно отметить, что данные гены 3p вовлечены в такие процессы как регуляция клеточного цикла, апоптоза и ангиогенеза (**RASSF1A**, **SEMA3B**), в процессы адгезии (**RHOA**,

CHLI), взаимодействия цитоскелета с внеклеточным матриксом (**DAGI**) и пр. Для генов **RASSF1A**, **RAR-beta2**, **SEMA3B** показана онко-супрессорная способность, а для **RHOA**, напротив, способность экзогенно вызывать трансформацию клеток *in vitro* и *in vivo* и участие в инвазии и метастазировании опухолей. Супрессорные гиперметилируемые миРНК, потенциально участвующие в регуляции генов 3p (*miR-9-1/3*, 34b/c, 124a-1/2/3, 193a, 212, 129-2, 148a, 132, 137, 125b-1, 375, 1258), также связаны с критичными процессами онкогенеза, как апоптоз, ангиогенез, ремоделирование хроматина, эпителиально-мезенхимальный переход, метастазирование.

Полученные данные показывают, что регуляция исследованных генов 3p может осуществляться на разных уровнях – на геномном - с участием метилирования их промоторных районов; на пост-транскрипционном - путем связывания с миРНК; и, опосредованно, через метилирование и инактивацию супрессорных миРНК. Интересно, что в регуляцию разных генов 3p потенциально вовлечены многие общие миРНК.

Таким образом, в представленной работе определены новые потенциальные регуляторные миРНК и их гены-мишени в патогенезе опухолей легкого и почки. Показана возможность опосредованного влияния метилирования генов регуляторных миРНК на взаимодействие с их генами-мишенями и на регуляцию их экспрессии в опухолях легкого и почки. Показана системная роль метилирования в регуляции генов и их взаимодействий.