

УДК 576.385.5.

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ микроРНК-219-1 И ЕЕ АССОЦИАЦИЯ С МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМОЙ

© 2021 А. Гасеми<sup>1</sup>, А. Мохаммади<sup>2</sup>, С. Фаллах<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), 14176-13151 Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), 14496-14535 Tehran, Iran; e-mail: fallah.s@iums.ac.ir

Поступила в редакцию 05.08.2020

После доработки 08.12.2020

Принята к публикации 29.12.2020

МикроРНК-219-1 (miR-219-1) известна как опухолевый супрессор, характерный для различных типов рака, однако до сих пор не изучен эпигенетический механизм, регулирующий экспрессию генов. Используя полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) и технологию бисульфитного секвенирования генома, были определены уровни метилирования промоторного участка гена miR-219-1 и уровни экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p в ткани мультиформной глиобластомы (GBM) ( $n = 31$ ) и близлежащих нормальных тканях ( $n = 31$ ), а также в линии клеток GBM U87 соответственно. После обработки клеток U87 мультиформной глиобластомы препаратом 5-аза-2'-дезоксифитидина (5-aza-dC) в них были определены уровни метилирования промоторного участка гена miR-219-1, соответствующих целевых mRNA, и белков с помощью модификации генома бисульфитом, ПЦР-РВ и методики ELISA соответственно. Наши результаты показали, что уровни экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p были значительно ниже у пациентов с GBM по сравнению с соседними нормальными тканями ( $p < 0,01$ ). Промотор miR-219-1 имел высокий уровень метилирования в тканях GBM ( $p < 0,01$ ). Также в тканях GBM наблюдалась отрицательная корреляция между экспрессией генов miRNA и уровнями метилирования ( $p < 0,01$ ). Обработка клеток GBM U87 препаратом 5-аза-dC приводила к снижению уровня метилирования miR-219-1, целевых mRNA и белков циклина A2 и муцина 4 (MUC4) и повышению уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p ( $p < 0,01$ ). Введение miR-219-5p и miR-219-1-3p приводило к подавлению экспрессии циклина A2 и MUC4, в результате чего наблюдалось снижение уровня пролиферации линии клеток GBM U87 ( $p < 0,01$ ). Эти результаты говорят о том, что метилирование DNA играет важную роль в регуляции гена miR-219-1, а гиперметилированная miR-219-1 может участвовать в патогенезе мультиформной глиобластомы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** miR-219-1, эпигенетика, GBM, мультиформная глиобластома.

DOI: 10.31857/S0320972521040047

### ВВЕДЕНИЕ

Ежегодная заболеваемость раком центральной нервной системы (CNS) составляет примерно 3,5 случаев на 100 000 человек, что достигает 1,9% всех вновь диагностированных случаев рака и 2,3% смертей от рака во всем мире [1]. Глиомы являются самыми распространёнными и приводящими к летальному исходу нейроэпителиальными опухолями, и они составляют большинство злокачественных опухолей головного мозга человека [2]. По клинико-патологическим показателям глиомы были классифи-

цированы Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) на разные стадии (I–IV) [3], а мультиформная глиобластома (GBM) является наиболее агрессивной формой (стадия IV) этих злокачественных опухолей головного мозга [2]. Средняя выживаемость пациента с впервые диагностированной GBM составляет 12–15 месяцев, а выживаемость в течение 5 лет – менее 3% [4]. Поэтому изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения и прогрессирования GBM, необходимо для улучшения традиционных терапевтических стратегий и облегчения разработки новых методов лечения этого агрессивного заболевания.

МикроRNA (miRNA) представляют собой небольшие некодирующие молекулы RNA (19–24 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне как у растений, так и у животных [5].

Принятые сокращения: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; 5-aza-dC – 5-аза-2'-дезоксифитидин; GBM – мультиформная глиобластома; miRNA – микроРНК (microRNA); MUC4 – муцин 4; U87MG – линия клеток GBM U87.

\* Адресат для корреспонденции.

Они участвуют в регуляции различных биологических процессов, протекающих при нормальном развитии, включая клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и многие другие молекулярные пути [6]. Было показано, что при различных патологических процессах, таких как рак, происходит изменение уровня экспрессии генов различных miRNA [7]. Кроме генетических механизмов, важную роль в контроле экспрессии miRNA играет эпигенетика: метилирование DNA и ковалентная модификация гистоновых белков [8], а гиперметилирование CpG-островков miRNA, подавляющих развитие опухоли, вносит вклад в канцерогенез [8, 9].

В результате процессинга предшественника miR-219-1, который осуществляет фермент Dicer, образуются две зрелых miRNA: одна с 5'-конца (miR-219-5p) и другая – с 3'-конца pre-miR-219-1 (miR-219-1-3p). В связи с тем, что эти два зрелых продукта процессинга обладают уникальными затравочными (seed) участками, каждая miRNA нацелена на разные mRNA (<http://www.mirbase.org/>). Недавнее исследование продемонстрировало, что miR-219-5p имеет низкий уровень экспрессии гена в глиоме и действует как опухолевый супрессор в клетках GBM [10].

Хотя исследование подтвердило, что Sal-подобный белок 4 является целевой mRNA miR-219-5p [10], циклин A2, идентифицированный как прямая мишень miR-219-5p при плоскоклеточной карциноме пищевода, также может оказывать онкогенное действие на глиому [11]. Также была показана роль в качестве опухолевого супрессора для miR-219-1-3p, нацеленной на ген, кодирующий муцин 4 (MUC4), при раке поджелудочной железы [12]. Однако несмотря на то что способность miR-219-1 подавлять опухолевый рост изучалась при различных типах рака, не было получено данных, касающихся эпигенетической модуляции miR-219-5p и miR-219-1-3p при мультиформной глиобластоме.

Хотя miR-219-1 является представителем miRNA, чья экспрессия при различных типах рака в значительной степени подавлена [10, 12], до сих пор в тканях GBM не определен уровень её экспрессии, эпигенетическая модификация и то, как этот регуляторный механизм может влиять на её функцию. С этой целью в настоящем исследовании изучалась связь между экспрессией гена miR-219-1 и уровнем гиперметилирования её промотора, а также было проанализировано, может ли эпигенетическая модификация этой miRNA привести к подавлению её мишеней.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы опухолевой ткани.** Исследовательские анализы были выполнены на 31 свежем образце опухоли GBM и прилегающих к ним гистологически нормальных тканях. В данном исследовании приняты участие 17 мужчин и 14 женщин в возрасте 25–79 лет (средний возраст – 59 лет). Подробные клинико-патологические характеристики образцов GBM представлены в таблице. Все образцы опухолевых тканей были получены в результате хирургической операции в отделении нейрохирургии госпиталя имама Резы (Тебриз, Иран) в соответствии с процедурой, одобренной Комитетом по исследованиям на людях.

Два патолога просмотрели все образцы. В исследовании использовались только первичные образцы тканей GBM. Ни один из пациентов до операции не подвергался переливанию крови, лучевой терапии или химиотерапии. Пациенты были исключены, если у них в анамнезе был диабет, фиброз печени, рассеянный склероз, шизофрения, а также некоторые виды рака (такие как гепатоцеллюлярная карцинома, папиллярная карцинома щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак и др.). Кроме того, окружающие опухоль нормальные ткани с какими-либо неопластическими опухолями и/или некротическими поражениями были исключены из исследования. После проведения операции все образцы мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования в настоящей работе. Для использования образцов опухолевой ткани от всех больных было получено письменное информированное согласие.

**Линия клеток, культивирование клеток и их обработка препаратом 5-aza-dC.** Линия раковых клеток человека GBM U87 (ATCC® HTB-14™) была приобретена в Институте Пастера (Иран), и её культивировали не более одного месяца после покупки. Клеточную линию культивировали в стерильных условиях при  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; «Life Technologies, Inc.», США), дополненной стрептомицином (100 мкг/мл), пенициллином (100 U/мл) («Life Technologies, Inc.»), 2 mM глутамина («Life Technologies, Inc.») и 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS, «Life Technologies, Inc.»). Чтобы выявить корреляцию между уровнем гиперметилирования промотора miR-219-1 и уровнем экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p, определяли уровни метилирования CpG-островка в промоторном участке гена miRNA и экспрессию исследуемых miRNA после инкубации клеток

GBM U87 (U87MG) в присутствии или при отсутствии 5-аза-2'-дезокситидина (5-aza-dC), используя метод бисульфитного секвенирования генома и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) соответственно. Вкратце, клетки GBM U87 рассеивали в 6-луночные планшеты по  $1 \times 10^5$  клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч. Затем добавляли свежую среду, содержащую 1 или 5 мкМ 5-аза-dC (чистота  $\geq 98\%$ ) («Sigma-Aldrich», США) и инкубировали в течение 72 ч. После завершения обработки агентом использованную среду сменяли на свежую, не содержащую 5-аза-dC, и клетки дополнительно культивировали в течение 48 ч. Исходные растворы 5-аза-dC растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО; «Sigma-Aldrich»), и устанавливали базовую линию при имитации обработки клеток тем же объёмом ДМСО в трех повторах.

**Определение уровня метилирования.** Метилирование промотора CpG-островков miR-219-1 определяли методом бисульфитного геномного секвенирования на геномной DNA, обработанной бисульфитом натрия. Вкратце, DNA экстрагировали из клеток линии U87MG и замороженных тканей с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit («Qiagen», Германия). Для проведения бисульфитной конверсии DNA 1 мкг экстрагированной DNA обрабатывали бисульфитом натрия, согласно инструкциям производителя набора EpiTect® Fast Bisulfite Conversion Kit («Qiagen»), и затем подвергали полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора праймеров: прямой праймер (5'-GTGATTTTTGATTTTTGTTTTTTT-3') и обратный праймер (5'-TTCACCTACACT-TATTSSAACAAC-3'). Условия термоциклирования состояния бисульфита DNA были следующие: 95°C – 5 мин, 60°C – 10 мин; 95°C – 5 мин, 60°C – 10 мин. Образцы очищали на колонке EpiTect spin-column и элюировали 15 мкл Buffer EB, прилагаемого в наборе. Чтобы определить картину метилирования в отдельной молекуле, для клонирования очищенных продуктов ПЦР в вектор pGEM-T Easy Vector мы использовали систему pGEM-T Easy Vector System II («Promega», США). С помощью скрининга «синий/белый» и анализатора DNA ABI 3730 XL («Applied Biosystem», США) секвенировали 8–10 клонов из каждого образца. Чтобы контролировать полное превращение DNA в результате действия бисульфита, цитозины (C), за которыми не следуют гуанины (цитозины, не входящие в состав CpG), были рассмотрены в анализируемом участке после проведения секвенирования. Так как после обработки бисульфитом и проведения ПЦР такие цитозины (не входящие в CpG-островки) должны превратиться

в тимин (T), присутствие C в этих положениях было индикатором неполного превращения бисульфита. Уровни метилирования каждого сайта CpG внутри ампликона DNA определяли количественно путём измерения отношения между значениями высоты пиков C и T, используя основное уравнение для определения процента метилирования:  $(C/(C + T) \times 100)$ .

**Экстракция RNA и ПЦР в реальном времени.** Препарат общей RNA, включающий различные miRNA, получали путём экстракции из всех тканей и клеток с помощью набора MirVanaTM miRNA Isolation Kit («Ambion», США) согласно инструкциям производителя. При изучении экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p, для синтеза комплементарной DNA (cDNA) использовали набор qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit («Quanta Bioscience», США). Для определения уровня экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p использовали наборы PerfeCTa® microRNA Assays («Quanta Biosciences», США) для определения miRNA, согласно инструкциям производителя для проведения ПЦР-РВ на амплификаторе Rotor-Gene 6000 («Qiagen»). Малая ядерная RNA U6 (U6 snRNA) использовалась в качестве эндогенного контроля для нормализации уровней экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p при применении метода сравнительного Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Значения относительного уровня экспрессии гена miRNA определяли с помощью метода  $2^{-\Delta Ct}$ .

Универсальный праймер, обычно входивший в набор, служил в качестве обратного праймера, а miRNA амплифицировали с помощью специфического прямого праймера. Наши специфические прямые праймеры для определения miR-219-5p и miR-219-1-3p были 5'-TGATTG-TCCAAACGCAATTCT-3' и 5'-AGAGTTGAG-TCTGGACGTCCCG-3' соответственно. Также прямым праймером U6 snRNA был 5'-ATTG-GAACGATACAGAGAAGATT-3', а обратным – 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'. Каждую количественную ПЦР-РВ проводили в двух повторах, и U6 snRNA использовали для нормализации уровня экспрессии miR-219-1.

Чтобы изучить уровни экспрессии генов, кодирующих белки MUC4 и циклин A2, 1 мкг общей RNA подвергали обратной транскрипции в комплементарную DNA. Затем раствор разводили в 10 раз. ПЦР-РВ осуществляли, используя специфические праймеры и метод SYBR Green detection technology, как было описано ранее [12, 13]. Значения относительного уровня экспрессии miR-219-1 определяли с помощью метода  $\Delta\Delta Ct$ .

**Иммуноферментный анализ (ELISA).** Определение содержания MUC4 и циклина A2 прово-

дили, используя наборы Human MUC4 ELISA Kit («My BioSource», США) и Rat Cyclin-A2 ELISA Kit («My BioSource») соответственно, в которых применялся количественный стандартный метод иммуноферментного анализа (метод ELISA).

**Трансфекция клеток и определение уровня пролиферации.** Обычно 10 нМ молекул-предшественников miR-219-5p и miR-219-1-3p, имитирующих miR-219-5p и miR-219-1-3p соответственно, и неспецифическую miRNA, служащую в качестве отрицательного контроля (NC), трансфицировали в клетки линии U87MG с использованием Lipofectamine™ RNAiMAX («Invitrogen», США). За день до трансфекции клетки помещали в среду, не содержащую антибиотиков. Клетки U87MG, трансфицированные miR-219-5p и miR-219-1-3p, культивировали, а затем инкубировали с 20 мкл бромдезоксипуридина (BrdU) в течение 2 ч. Клетки фиксировали, и включённую метку BrdU регистрировали с помощью набора BrdU Cell Proliferation Kit («Abcam», США) согласно инструкции производителя.

**Статистическая обработка данных.** Для сравнения усреднённых значений уровня метилирования и экспрессии гена miR-219-1 в тканях GBM и прилегающих нормальных тканях использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения средних значений уровня метилирования и экспрессии гена miR-219-1, MUC4 и циклина A2 в клетках до и после их обработки 5-azadC использовали метод ANOVA. Коэффициент линейной корреляции Пирсона был использован для изучения взаимосвязи между метилированием промоторного участка miR-219-1 и уровнем экспрессии гена, кодирующего эту miRNA. Статистический анализ был проведён с использованием программы SPSS version 22.0, и значение  $p < 0,05$  рассматривалось как статистически достоверное различие.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**MiR-219-1 и клинично-патологические характеристики пациентов с мультиформной глиобластомой.** Взаимосвязь между экспрессией гена miR-219-1, уровнями метилирования и клинично-патологическими характеристиками была оценена у 31 пациента с GBM. Поскольку наша группа пациентов состояла из относительно небольшого количества образцов опухоли GBM ( $n = 31$ ), для получения более точных результатов мы объединили miR-219-5p ( $n = 31$ ) и miR-219-1-3p ( $n = 31$ ) уровни экспрессии гена как miR-219-1 и изучили взаимосвязь между

экспрессией гена miR-219-1 ( $n = 62$ ), уровнем метилирования ( $n = 31$ ) и клинично-патологическими характеристиками больных GBM. На основании среднего значения уровней экспрессии и метилирования miR-219-1 все пациенты с GBM были разделены на четыре группы: пациенты с низким ( $n = 37$ ) и высоким ( $n = 25$ ) уровнем экспрессии гена miR-219-1 и пациенты с низким ( $n = 13$ ) и высоким уровнями метилирования miR-219-1 ( $n = 18$ ). Как показано в таблице, в исследуемой группе пациентов не было выявлено статистически достоверных различий между экспрессией гена miR-219-1, уровнем метилирования и возрастом ( $<50$  и  $\geq 50$ ), полом (мужской/женский), расположением опухоли (лобная доля, височная доля, теменная доля и затылочная доля). Однако проведённый нами статистический анализ показал, что пониженный уровень экспрессии гена и высокий уровень метилирования miR-219-1 в образцах пациентов ассоциированы с размером опухоли ( $<5$  см против  $\geq 5$  см) и шкалой Карновского (KPS – Karnofsky Performance Scale;  $<80$  против  $\geq 80$ ).

**Уровни экспрессии miR-219-1 и её генов-мишеней в тканях GBM.** С помощью метода ПЦР-РВ мы определили уровни экспрессии miR-219-5p, miR-219-1-3p, циклина A2 и MUC4 у пациентов с GBM в опухолевой ткани и в прилегающих нормальных тканях. Для сопоставления экспрессии miRNA и их генов-мишеней в образцах опухолевой ткани и прилегающих нормальных тканей мы использовали сравнительный метод Ст. Нами было выявлено снижение уровня экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p в 27 (87%) и 25 (80%) образцах тканей GBM по сравнению с прилегающими нормальными тканями соответственно.

Как показано на рис. 1, *a* и *b*, у пациентов в образцах GBM наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p по сравнению с прилегающими нормальными тканями (*t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,01$ ). Как показано на рис. 1, *c* и *d*, мы также обнаружили повышенную экспрессию генов, кодирующих циклин A2 (1,60 против 0,39; *t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,01$ ) и MUC4 (1,71 против 0,62; *t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ) в образцах GBM по сравнению с прилегающими нормальными тканями. Высокие уровни экспрессии циклина A2 и MUC4 в тканях GBM указывают на то, что эти онкогены могут принимать участие в канцерогенезе глиомы.

**Статус метилирования промотора гена miR-219-1 в тканях GBM.** Используя программу methprimer ([www.urogene.org/methprimer/](http://www.urogene.org/methprimer/)) и вставив 3000 нуклеотидов из вышележащей об-

Корреляция уровня экспрессии и метилирования гена miR-219-1 с клинико-патологическими показателями больных с мультиформной глиобластомой

Характеристика	Уровень экспрессии гена miR-219-1 ( $n = 62^*$ )		Значение $p$	Уровень экспрессии гена miR-219-1 ( $n = 31$ )		Значение $p$
	Низкий ( $n = 37$ ) $n$ (%)	Высокий ( $n = 25$ ) $n$ (%)		Низкий ( $n = 13$ ) $n$ (%)	Высокий ( $n = 18$ ) $n$ (%)	
Возраст (годы)						
<50	16 (43)	12 (48)	0,61	6 (46)	8 (44)	0,61
≥50	21 (57)	13 (52)		7 (54)	10 (56)	
Пол						
Мужской	21 (57)	13 (52)	0,53	7 (54)	10 (55)	0,69
Женский	16 (43)	12 (48)		6 (46)	8 (45)	
Расположение опухоли						
Лобная доля	9 (24)	5 (20)	0,42	3 (23)	4 (22)	0,71
Височная доля	10 (27)	6 (24)		3 (23)	5 (28)	
Теменная доля	10 (27)	8 (32)		4 (31)	5 (28)	
Затылочная доля	8 (22)	6 (24)		3 (23)	4 (22)	
Размер опухоли						
<5 см	11 (30)	17 (68)	0,016	9 (69)	5 (28)	0,023
≥5 см	26 (70)	8 (32)		4 (31)	13 (72)	
KPS						
<80	23 (62)	9 (36)	0,021	4 (31)	12 (67)	0,017
≥80	14 (38)	16 (64)		9 (69)	6 (23)	

\* Общее число определений уровня экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p; GBM – мультиформная глиобластома; KPS – шкала Карновского для оценки общего состояния онкобольного.

ласти miR-219-1, мы обнаружили CpG-островок в промоторном участке miR-219-1 (от –2802 до –2952), на котором локализуется 22 CpG-повтора (рис. 2, *a*). Анализ относительного уровня метилирования с использованием субклонирования продуктов ПЦР и метода бисульфитного секвенирования выявил повышение уровня метилирования гена miR-219-1 у пациентов с GBM (70,7%) по сравнению с прилегающими нормальными тканями (16,4%;  $t$ -критерий Стьюдента,  $p < 0,01$ ; рис. 2, *b* и *c*).

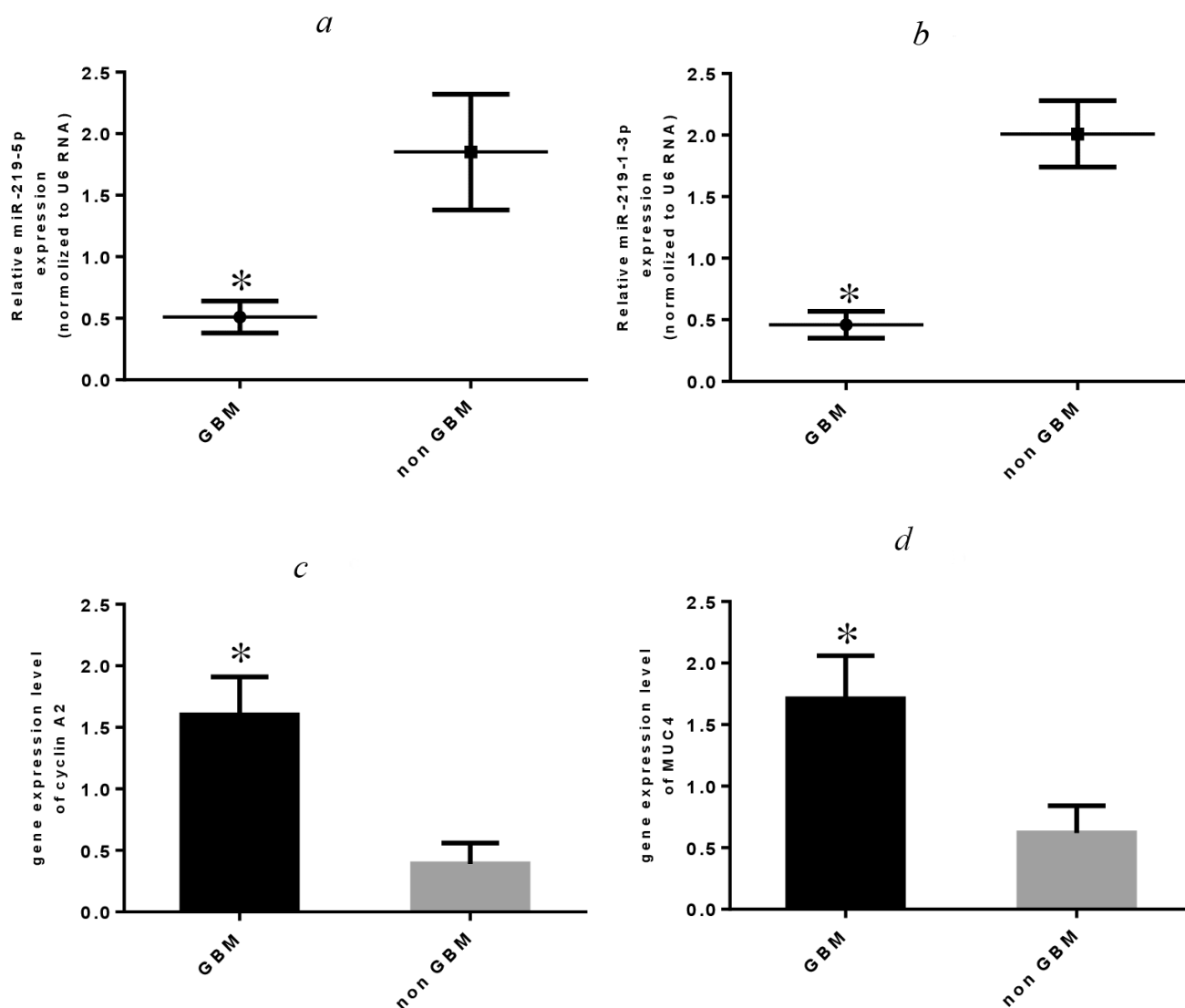
Чтобы определить, является ли подавление miR-219-1 в GBM результатом гиперметилирования его промотора, мы дополнительно провели анализ корреляции между метилированием промотора miR-219-1 и уровнями экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p в образце пациента GBM. Как показано на рис. 2, *d*, корреляционный анализ Пирсона показал, что уровни экспрессии генов miR-219-5p ( $R = -0,82$ ,  $p < 0,01$ ) и miR-219-1-3p ( $R = -0,75$ ,  $p < 0,01$ ) отрицательно коррелировали с гиперметилированием промотора miR-219-1. Эти данные предполагают, что гиперметилирование промоторного участка гена miR-219-1 в тканях GBM может привести к снижению уровня экспрессии гена.

Влияние 5-aza-dC на уровни метилирования и экспрессии генов miR-219-1. Чтобы оценить влияние 5-aza-dC на уровень метилирования промотора гена miR-219-1, был определен средний уровень метилирования промотора miRNA до и после обработки (в течение 72 ч) клеточной линии U87MG с помощью 1 или 5 мкМ препарата 5-aza-dC. Перед началом эксперимента метод секвенирования геномных бисульфитов показал

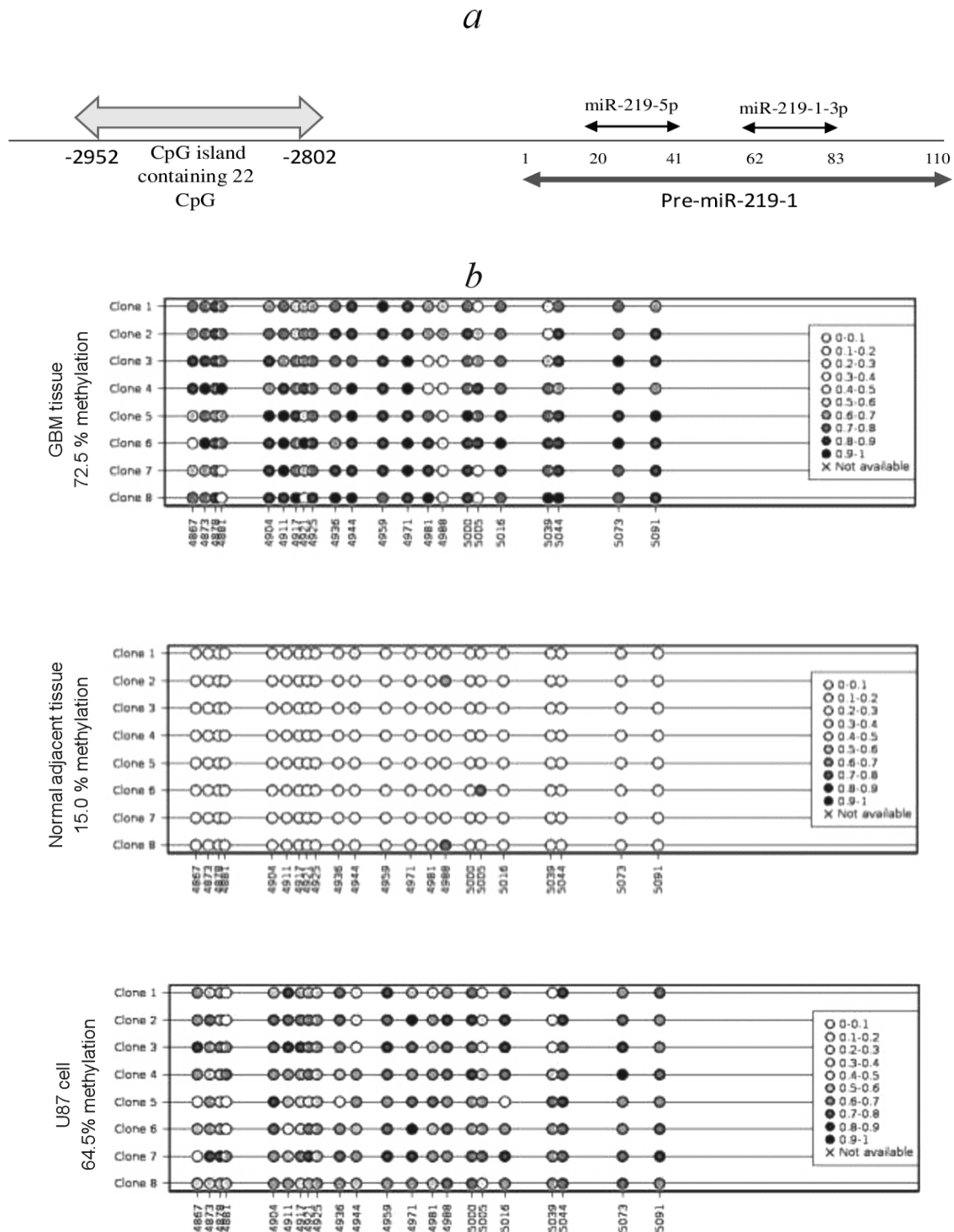
Влияние 5-aza-dC на уровни метилирования и экспрессии генов miR-219-1. Чтобы оценить влияние 5-aza-dC на уровень метилирования промотора гена miR-219-1, был определен средний уровень метилирования промотора miRNA до и после обработки (в течение 72 ч) клеточной линии U87MG с помощью 1 или 5 мкМ препарата 5-aza-dC. Перед началом эксперимента метод секвенирования геномных бисульфитов показал

в промоторном участке гена *miR-219-1* средний уровень метилирования – 64,5%. Однако обработка клеток (в течение 72 ч) препаратом 5-aza-dC в концентрации 1 или 5 мкМ снизила уровень метилирования *miR-219-1* на 26% и 51% соответственно. Эти результаты показали, что 5-aza-dC способен снижать средний уровень метилирования *miR-219-1* в промоторном участке (рис. 3, *a*). Кроме того, чтобы изучить влияние 5-aza-dC на уровень экспрессии гена *miR-219-1*, используя ПЦР-РВ, мы определили уров-

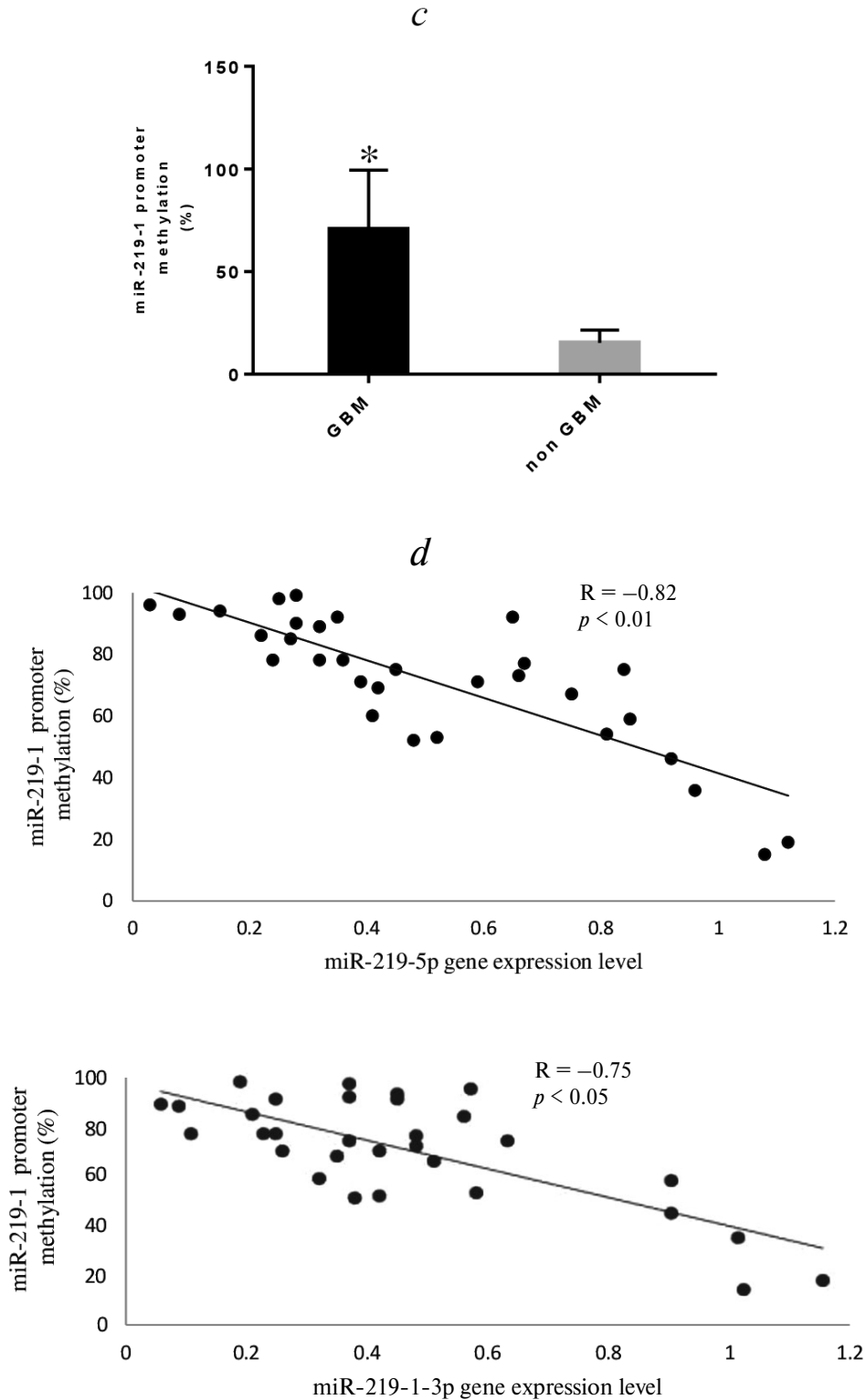
ни экспрессии *miR-219-5p* и *miR-219-1-3p* до и после обработки клеток препаратом 5-aza-dC в концентрации 1 или 5 мкМ. Как показано на рис. 3, *b*, в результате деметилирования DNA с помощью 1 или 5 мкМ 5-aza-dC происходит повышение уровня экспрессии *miR-219-5p* в клетках U87MG в 1,9 и 4,1 раза соответственно. Также обработка клеток 1 или 5 мкМ 5-aza-dC вызвала повышение уровня экспрессии генов *miR-219-1-3p* в 1,8 и 3,2 раза соответственно (рис. 3, *c*).



**Рис. 1.** Уровни экспрессии генов *miR-219-5p*, *miR-219-1-3p*, циклина A2 и MUC4 в образцах GBM. Для определения с помощью метода  $2^{-\Delta CT}$  уровня экспрессии *miRNA* и генов-мишеней в образцах GBM и прилегающих нормальных тканей использовали метод ПЦР-РВ. *MiR-219-5p* (*a*) и *miR-219-1-3p* (*b*) имели низкие уровни экспрессии генов у пациентов с GBM ( $n = 31$ ) по сравнению с соседней нормальной тканью без GBM ( $n = 31$ ). Экспрессию *miRNA* в отдельных образцах опухолевой ткани выражали относительно U6 snRNA (\*  $p < 0,01$ ). Также наблюдалось значительное увеличение уровней экспрессии генов циклина A2 (*c*) и MUC4 (*d*) у пациентов с GBM в сравнении с нормальными прилегающими тканями. Результаты были нормализованы относительно уровня mRNA  $\beta$ -актина (ACTB). Все данные по экспрессии генов, касающиеся индивидуальных образцов тканей человека, представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение;  $p < 0,01$  для всех образцов опухолей GBM в сравнении с образцами без GBM

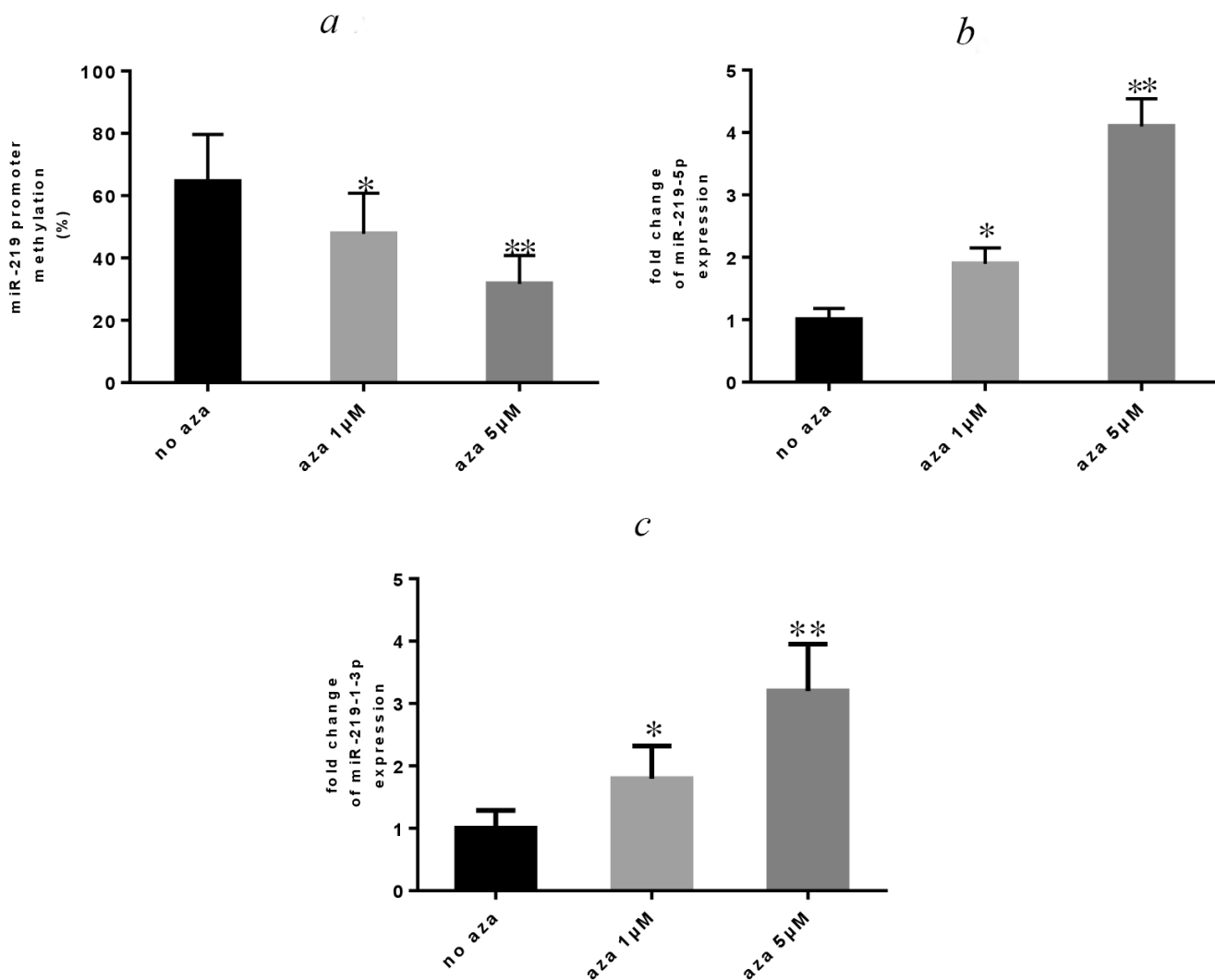


**Рис. 2.** Метилирование участков DNA, расположенных выше гена miR-219-1, и его связь с уровнем экспрессии гена. *a* – Картирование CpG-островков, показывающее их количество и расположение относительно промотора miR-219-1. Для проведения анализа метилирования был использован CpG-островок, включающий 151 п.н. (от –2802 до –2952 п.н., расположенных ниже кодона инициации pre-miR-219-1, охватывающий 22 сайта CpG). *b* – Схема распределения CpG-островков в промоторном участке miR-219-1 в случайно выбранном образце ткани GBM, соответствующей прилегающей нормальной ткани и клетках линии U87MG. Для каждого образца секвенировали по 8 отдельных клонов. Каждая строка представляет уровень метилирования отдельных CpG (в диапазоне от 0 до 1) в отдельном клоне, за исключением последней строки, которая представляет положение каждого CpG на хромосоме. Для упрощения первые четыре цифры каждой позиции CpG (3320) были удалены из сайтов CpG. Поэтому положение 4867 для CpG точно представляет 33204867-й нуклеотид на хромосоме 6



**Рис. 2.** Метилирование участков DNA, расположенных выше гена miR-219-1, и его связь с уровнем экспрессии гена. *c* – Как можно видеть, есть значительные различия между уровнем метилирования промоторного участка гена miR-219-1 в тканях GBM и близлежащих нормальных тканях пациентов (\* $p < 0,01$ ). Полученные данные были представлены в виде процента метилированных цитозинов CpG-островка ( $C/(C + T) \times 100$ ). *d* – Корреляция между уровнем метилирования промотора гена miR-219-1 и экспрессией генов miR-219-5p в образцах тканей GBM и между уровнем метилирования промотора гена miR-219-1 и экспрессией генов miR-219-1-3p в образцах тканей GBM. Как показано, уровень метилирования miR-219-1 в значительной степени отрицательно коррелировал с уровнями экспрессии генов miR-219-5p ( $R = -0,82$ ) и miR-219-1-3p ( $R = -0,75$ ) ( $p < 0,01$ )





**Рис. 3.** Влияние 5-aza-dC на уровни метилирования и экспрессии гена miR-219-1. Клетки линии U87MG были обработаны 5-aza-dC в концентрации 1 или 5 мкМ в течение 72 ч. Как видно (*a*), различные концентрации 5-aza-dC через 72 ч снижали уровень метилирования промотора miR-219-1. Противоположные результаты были получены при изучении зависимости от дозы и времени обработки в случае уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p, когда гипометилирование под воздействием 5-aza-dC индуцировало экспрессию генов (*b* и *c*). Столбики ошибок представляют стандартные отклонения трех повторностей ПЦР из одного экспериментального набора, а *p* представляет собой статистическую разницу между группами клеток (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ); aza – 5-aza-dC

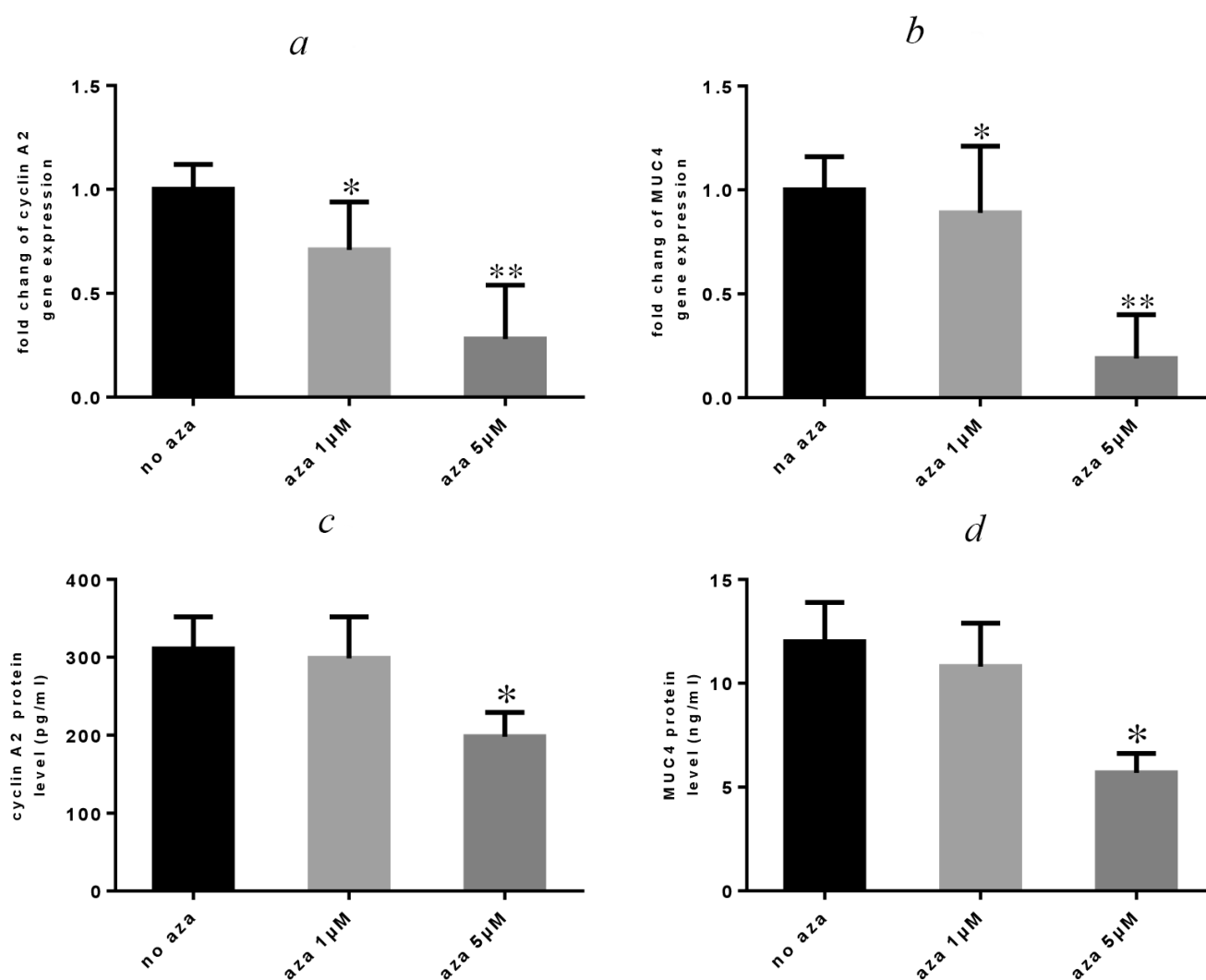
**Влияние 5-aza-dC на экспрессию генов циклина A2 и MUC4 и уровни этих белков.** Чтобы изучить влияние 5-aza-dC на уровни экспрессии генов циклина A2 и MUC4 и уровни самих белков, клетки U87MG обрабатывали 1 или 5 мкМ 5-aza-dC в течение 72 ч, далее использовали методы ПЦР-РВ и ELISA соответственно. Наши результаты показали, что после обработки клеток 1 или 5 мкМ 5-aza-dC происходило снижение уровня экспрессии гена циклина A2 (в 0,29 и 0,72 раза соответственно; рис. 4, *a*). Кроме того, деметилирование DNA с помощью 1 или 5 мкМ 5-aza-dC приводило к снижению уровня экспрессии гена MUC4 в клетках U87MG (в 0,11

и 0,81 раза соответственно; рис. 4, *b*). Однако, как показано на рис. 4, *c* и *d*, обработка клеток 1 мкМ 5-aza-dC не приводила к снижению уровня циклина A2 и MUC4, а восстановление уровня этих белков происходило только в случае обработки клеток 5 мкМ 5-aza-dC. С помощью метода ELISA был определен уровень циклина A2 в необработанных клетках U87MG, он составлял 310,8 пкг/мл. Обработка клеток препаратом 5-aza-dC в концентрации 1 или 5 мкМ вызывала снижение уровня циклина A2 на 12,1 пкг/мл ( $p > 0,05$ ) и 112,7 пкг/мл ( $p < 0,01$ ) соответственно. Концентрация белка MUC4 в необработанных клетках U87MG составляла

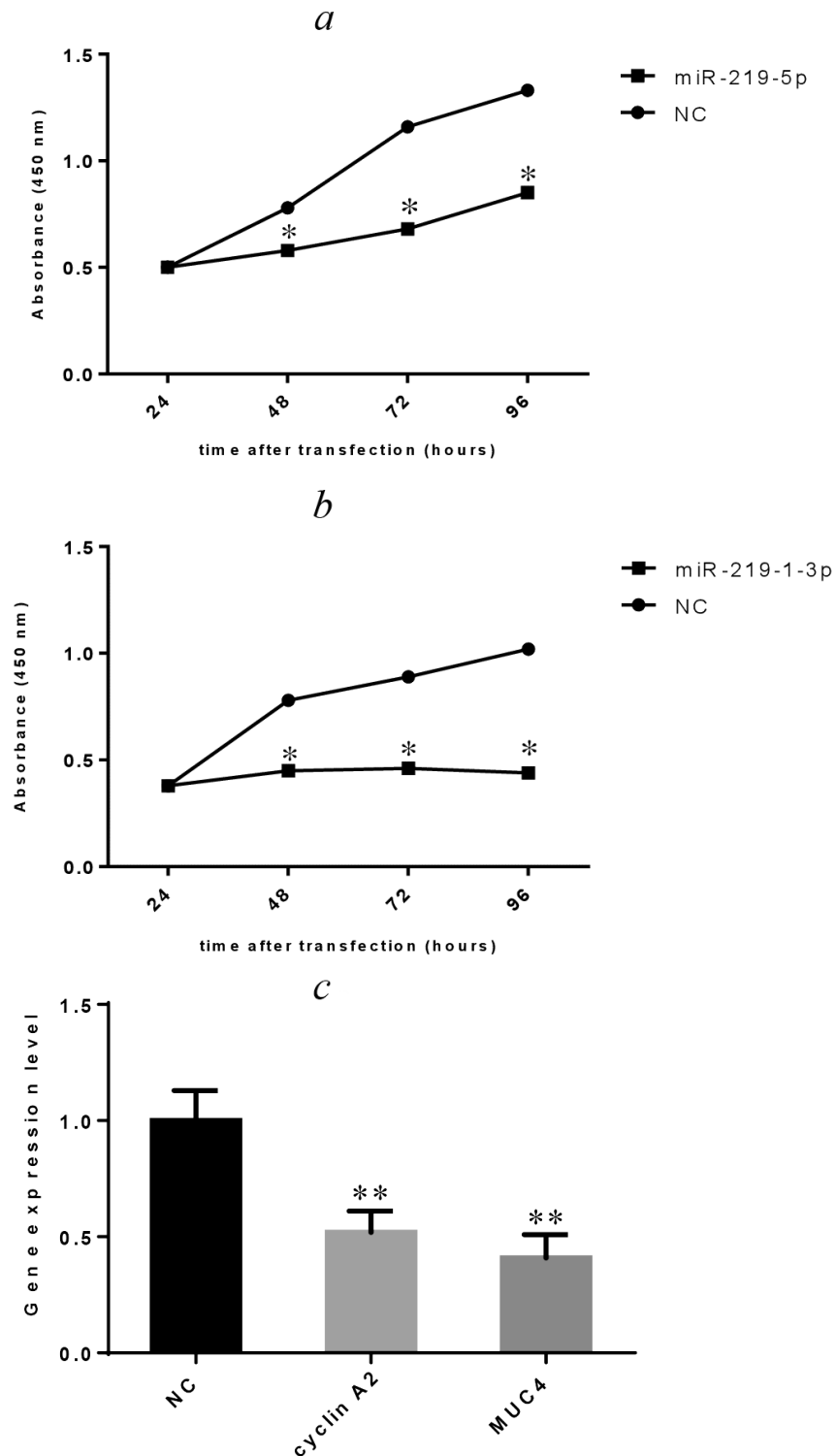
12 нг/мл, и наблюдалось снижение его содержания на 1,2 нг/мл ( $p > 0,05$ ) и 6,3 нг/мл ( $p < 0,01$ ) после обработки клеток 1 или 5 мкМ 5-aza-dC соответственно (рис. 4, *d*).

**Подавляющее влияние эктопической экспрессии miR-219-1 на гены-мишени и скорость пролиферации клеток.** Поскольку в нашей работе получены доказательства того, что в клетках U87MG понижены уровни экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p, а их промоторный участок гиперметилирован, мы исследовали, может ли восстановление экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p, опосредованное временной трансфекцией клеток двуцепочечной RNA (dsRNA), имитирующей miR-219-5p и miR-219-

1-3p, в клетки U87MG, привести к подавлению клеточной пролиферации. Полученные нами результаты подтверждают, что трансфекция клеток dsRNA, имитирующей miR-219-5p и miR-219-1-3p, приводит к повышению уровня экспрессии генов кандидатных miRNA в 4 и 5 раз соответственно, и восстановление уровня этих miRNA вызывает значительное снижение уровня пролиферации клеток U87MG (рис. 5, *a* и *b*;  $p < 0,01$ ). Эти данные позволяют предположить, что miR-219-15p и miR-219-1-3p могут обладать антипролиферативным влиянием в клетках U87MG. Чтобы подтвердить роль циклина A2 и MUC4 в качестве мишеней действия miR-219-5p и miR-219-1-3p, мы провели ПЦР-РВ на



**Рис. 4.** Влияние 5-aza-dC на экспрессию генов, кодирующих циклин A2 и MUC4, и на уровни самих белков. Клетки глиобластомы линии U87MG были обработаны 1 или 5 мкМ 5-aza-dC в течение 72 ч. Уровни экспрессии генов циклина A2 (*a*) и MUC4 (*b*) снижались после обработки клеток 1 или 5 мкМ 5-aza-dC, но при этом не было выявлено статистически достоверных различий между уровнями белков циклин A2 (*c*) и MUC4 (*d*) после обработки клеток 1 мкМ 5-aza-dC в течение 72 ч. Понижение уровня циклина A2 (*c*) и MUC4 (*d*) наблюдалось только после обработки клеток 5 мкМ 5-aza-dC в течение 72 ч (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ); aza – 5-aza-dC



**Рис. 5.** Подавление опухолевых клеток U87MG с помощью miR-219-1. В клетки трансфицировали 10 нМ молекулы-предшественника pre-miR miRNA, имитирующей miR-219-5p, miR-219-1-3p или контрольную неспецифическую dsRNA (pre-miR NC #1) с использованием реагента Lipofectamine TM RNAiMAX. Количество жизнеспособных клеток через 24–96 ч после трансфекции оценивали с помощью анализа пролиферации клеток, используя бромдезоксипридин (BrdU). Точки – средние значения трех измерений в этих экспериментах; \*  $p < 0,05$  по сравнению с клетками, трансфицированными pre-miR NC #1, в статистическом анализе с помощью *U*-критерия Манна–Уитни (а). Трансфекция 10 нМ miR-219-5p и miR-219-1-3p через 48 ч вызвала снижение уровня транскриптов циклина A2 и MUC4 на 43% и 51% соответственно в клетках U87MG по сравнению с клетками, трансфицированными 10 нМ контрольного олигонуклеотида (б). Уровни экспрессии генов циклина A2 и MUC4 определяли с помощью ПЦР-РВ с использованием  $\beta$ -актина в качестве контроля. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD независимых экспериментов (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

клетках U87MG, трансфицированных молекулами, имитирующими miR-219-5p и miR-219-1-3p. Наши результаты показали, что трансфекция клеток miR-219-5p и miR-219-1-3p через 48 ч приводит к снижению уровня mRNA циклина A2 и MUC4 (рис. 5, с;  $p < 0,01$ ) по сравнению с клетками, трансфицированными miRNA, служащей в качестве отрицательного контроля.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы были проведены несколько исследований с целью определения профиля экспрессии miRNA при GBM [14, 15]. В этих работах было продемонстрировано, что в тканях GBM картина экспрессии генов miRNA отличается от таковой в нормальных тканях. Было высказано предположение, что нарушение регуляции экспрессии miRNA может быть связано с патогенезом GBM. В настоящей работе нами была выявлена пониженная экспрессия miR-219-5p и miR-219-1-3p в GBM по сравнению с прилегающими нормальными тканями. Результат низкого уровня экспрессии гена miR-219-5p согласуется с предыдущими исследованиями [16]. Но хотя было показано снижение уровня экспрессии гена miR-219-1-3p при раке поджелудочной железы [12], не было данных об уровне экспрессии гена miR-219-1-3p в тканях GBM.

Мы также обнаружили, что низкий уровень экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p ассоциирован с размером опухоли пациентов с GBM и индексом KPS (шкала Карновского). Ранее была определена связь между низким уровнем экспрессии гена miR-219-1 (miR-219-5p) и клинико-патологическими характеристиками пациента, такими как продвинутая стадия по классификации ВОЗ и индекс KPS [10]. Поскольку в нашу группу пациентов входили люди с наиболее агрессивными стадиями глиомы (стадия IV или GBM) не относящимися к глиомам, классифицированным ВОЗ (I, II, III и IV), мы не могли использовать классификацию ВОЗ в качестве переменной величины в нашей работе по изучению экспрессии генов. KPS является простым методом определения функционального статуса. Он может быть использован для оценки эффективности лечения рака, качества жизни пациентов и прогноза. Величина индекса Карновского (KPS) варьирует от 100 до 0, где 100 означает «отсутствие признаков заболевания» и 0 – «смерть». В связи с обнаружением ассоциации между уровнем экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p и индексом KPS можно предположить, что снижение уровня экспрес-

сии генов наших кандидатных miRNA имеет отношение к прогнозу исхода заболевания пациента.

Мы обнаружили гиперметилование CpG-островков в промоторном участке miR-219-1 в тканях GBM по сравнению с нормальными близлежащими тканями, что может объяснять, по крайней мере частично, эпигенетическое молчание miR-219-1 в тканях GBM. Появляется все больше данных о том, что гиперметилование промоторного участка DNA может участвовать в подавлении генов-супрессоров опухолей в отдельных раковых клетках [17]. Интересно, что в некоторых исследованиях было показано, что экспрессия многих miRNA, выступающих в раковых клетках в качестве опухолевых супрессоров, снижается при гиперметилировании их промоторов [18–20]. Вероятно, опосредованное метилированием DNA подавление miRNA-супрессоров опухолей может вносить свой вклад в качестве нового механизма на разных стадиях рака. Отклоняющееся от нормы метилирование DNA miR-219-1 связывалось со случаями, не относящимися к раку, в том числе при хронической боли, связанной с воспалением, и длительными рабочими сменами в ночное время [21, 22]. Однако до сих пор не было исследований метилирования DNA в случае miR-219-1 (miR-219-5p и miR-219-1-3p) при GBM. Поэтому в настоящее время наша работа является единственным исследованием, направленным на изучение статуса метилирования miR-219-1 у пациентов с GBM. Причина, по которой мы выбрали miR-219-1 в качестве гена-кандидата для изучения эпигенетической модификации, заключается в том, что анализ промоторов с помощью программы methprimer ([www.urogene.org/methprimer/](http://www.urogene.org/methprimer/)) выявил большой CpG-островок внутри её промоторного участка. Поэтому было предположено, что гиперметилование промоторного участка этой miRNA может иметь отношение к снижению уровня её экспрессии. Поскольку регуляция экспрессии miRNA с помощью метилирования молекулы DNA носит сложный характер, необходимы дальнейшие исследования паттернов метилирования miRNA при GBM.

В нашем исследовании показано, что обработка клеток мультиформной глиобластомы линии U87MG препаратом 5-aza-dC привела к повышению уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p и снижению уровня экспрессии генов, кодирующих циклин A2 и MUC4 соответственно. Была предсказана тесная связь между нарушением экспрессии циклина A2, нестабильностью хромосом и пролиферацией опухолевых клеток, а повышенная экспрессия гена

циклина A2 была обнаружена при различных типах рака [23]. Также было показано, что повышенная экспрессия мембраносвязанного гликопротеина MUC4 может привести к прогрессированию рака эпителия, агрессивному поведению опухоли, снижению эффективности методов лечения и плохому исходу [24]. Поскольку нарушение процесса метилирования DNA может привести к снижению экспрессии miRNA, вполне разумно, что деметилирующий агент, 5-aza-dC, имеет отношение к восстановлению уровня miR-219-1, что может, в свою очередь, привести к снижению уровня мишеней для действия miRNA (циклина A2 и MUC4, которые являются мишенями miR-219-5p и miR-219-1-3p соответственно). 5-aza-dC, аналог нуклеозида, включается в DNA быстрорастущих опухолевых клеток во время репликации и ингибирует метилирование DNA, улавливая DNA-метилтрансферазы на DNA, что приводит к их истощению внутри клетки [25].

В настоящем исследовании было показано, что уровни белков циклин A2 и MUC4 снижались только при обработке клеток высокими концентрациями 5-aza-dC (5 мкМ). Низкие концентрации деметилирующего агента (1 мкМ) не оказывали влияния на уровни белков-мишеней. Кроме того, не было выявлено корреляции между различными концентрациями 5-aza-dC и снижением уровня белков-мишеней. Другими словами, уровни белков циклин A2 и MUC4 не снижались в 5 раз по сравнению с 1-кратным снижением уровней белка на 1 мкМ 5-aza-dC. В целом не было выявлено строгой корреляции между уровнем белков в клетке и обилием соответствующих mRNA. Часто величина корреляции составляет ~0,40, и это означает, что только ~40% различий в концентрации белка можно объяснить, зная значение концентрации mRNA [26]. Чтобы объяснить оставшиеся ~60% вариаций, нужно учесть вклад некоторой комбинации посттранскрипционной регуляции и шума измерения.

Полученные нами результаты подтвердили, что miR-219-5p и miR-219-1-3p оказывают антипролиферативное действие в отношении линии клеток U87MG. С помощью метода усиления функции (gain-of-function approach) Jiang et al. [10] трансфицировали клетки глиомы имитаторами miR-219-5p и определяли пролиферацию, миграцию и инвазию клеток. Эти авторы показали, что эктопическая miR-219-5p вызывает снижение скорости роста клеток, и пришли к заключению, что miR-219-5p принимает участие в негативной регуляции клеточного роста. В аналогичном исследовании Lahdoui et al. [12] после обнаружения повышен-

ной экспрессии miR-219-1-3p в линии клеток рака поджелудочной железы также выявили подавление клеточной пролиферации, ассоциированное с пониженной миграцией клеток. MiRNA оказывают огромное влияние на развитие и прогрессирование рака путём подавления репрессии mRNA онкогена и/или опухолевого супрессора или блокирования трансляции белка. Воздействуя на свои мишени (онкогены или опухолевые супрессоры), miRNA действуют как онкогенные (влияя на опухолевый супрессор) или подавляющие развитие опухоли (влияя на онкоген) молекулы [27]. Поскольку онкогенные функции mRNA-мишеней miR-219-5p и miR-219-1-3p, циклина A2 (в плоскоклеточных клетках пищевода) и MUC4 (в клетках опухоли поджелудочной железы) были описаны в предыдущих работах [23, 24], было предположено, что наши кандидатные miRNA в качестве молекул-супрессоров опухолей способны останавливать клеточную пролиферацию раковых клеток, включая GBM. Наиболее очевидные отличия между нашим исследованием и предыдущими исследованиями заключаются в следующем: 1) в предыдущих работах не предоставлены доказательства существования механизма, лежащего в основе низкого уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p и 2) не было данных, касающихся восстановления активности супрессированной кандидатной miRNA с использованием эпигенетических факторов, и последующего влияния восстановления этой активности на способность miRNA подавлять развитие опухоли.

Есть несколько ограничений в нашем исследовании, которые могут быть рассмотрены в будущих исследованиях. Во-первых, это исследование было разработано на относительно небольшом размере выборки, что ограничило нас в получении более точных результатов, особенно в области взаимосвязи между характеристиками пациента и экспрессией генов miRNA. Поэтому для подтверждения полученных нами результатов потребуются проведение других исследований с использованием выборки большего размера. Во-вторых, мы исследовали только онкогенные мишени кандидатных miRNA, которых коснулось метилирование DNA. В связи с тем, что у каждой отдельной miRNA имеются многочисленные онкогенные или подавляющие опухоль мишени, необходимо провести обширный анализ, чтобы картировать сеть взаимосвязей между эпигенетической модификацией miRNA и экспрессией их mRNA-мишеней. Наконец, в настоящей работе мы использовали близлежащую нормальную ткань в качестве контроля. Отсутствие обширных исследований, ограниченность данных и малоизвестность гло-

бального профиля экспрессии генов этого типа контрольных субъектов в GBM не позволяет нам сделать однозначные выводы. Следовательно, для получения более реалистичных результатов в будущих исследованиях необходимо подготовить транскриптомное профилирование нормальной прилегающей ткани при GBM.

В заключение мы изучили роль эпигенетической регуляции miR-219-1 в патогенезе GBM человека. По нашему мнению, наши исследования впервые показали, что 1) miR-219-5p и miR-219-1-3p представляют собой чувствительные к метилированию miRNA при развитии GBM; 2) восстановление уровня экспрессии кандидатных miRNA с помощью деметилирующих агентов приводит к снижению уровня онкогенных mRNA-мишеней и соответствующих белков. Полученные результаты показывают, что картина лечения, основанная на анализе экспрессии miRNA, может служить в качестве основы для

разработки новых потенциальных методов лечения GBM, и мы ожидаем в ближайшем будущем проведения дальнейших исследований и разработок в области эпигенетических лекарств.

**Финансирование.** Выполнение данной работы было поддержано IUMS (IRNA University of Medical Sciences) (проект № 24756).

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

**Соответствие этическим стандартам.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального исследовательского комитета, а также Хельсинкской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней или сопоставимым этическим стандартам. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2008. Estimated Incidence, Mortality and 5-Year Prevalence: Both Sexes. Available online: <http://globocan.iarc.fr> (accessed on 16 October 2013).
- Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E., and Kruchko, C. (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009, *Neuro Oncol.*, **14**, v1-v49.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta. Neuropathol.*, **114**, 97-109.
- Wen, P. Y., and Kesari, S. (2008) Malignant gliomas in adults, *N. Engl. J. Med.*, **359**, 492-507.
- Bartel, D. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281-297.
- Vidigal, J. A., and Ventura, A. (2015) The biological functions of miRNAs: lessons from *in vivo* studies, *Trends Cell Biol.*, **25**, 137-147.
- Reddy, K. B. (2015) MicroRNA (miRNA) in cancer, *Cancer Cell Int.*, **15**, 38.
- Liu, X., Chen, X., Yu, X., Tao, Y., Bode, A. M., et al. (2013) Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **32**, 96.
- Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Yamagata, A., Shimamura, T., et al. (2019) Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers, *Nat. Commun.*, **10**, 3888.
- Jiang, B., Li, M., Ji, F., and Nie, Y. (2017) MicroRNA-219 exerts a tumor suppressive role in glioma via targeting Sal-like protein 4, *Exp. Ther. Med.*, **14**, 6213-6221.
- Ma, Q. (2019) MiR-219-5p suppresses cell proliferation and cell cycle progression in esophageal squamous cell carcinoma by targeting CCNA2, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **24**, 4.
- Lahdaoui, F., Delpu, Y., Vincent, A., Renaud, F., Messenger, M., et al. (2015) miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer, *Oncogene*, **34**, 780-788.
- Lee, R. S., Sohn, S., Shin, K. H., Kang, M. K., Park, N. H., and Kim, R. H. (2017) Bisphosphonate inhibits the expression of cyclin A2 at the transcriptional level in normal human oral keratinocytes, *Int. J. Mol. Med.*, **40**, 623-630.
- Piwecka, M., Rolle, K., Belter, A., Barciszewska, A. M., Zywicki, M., et al. (2015) Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues, *Mol. Oncol.*, **9**, 1324-1340.
- Ondracek, J., Fadrus, P., Sana, J., Besse, A., Loja, T., et al. (2017) Global microRNA expression profiling identifies unique microRNA pattern of radioresistant glioblastoma cells, *Anticancer Res.*, **37**, 1099-1104.
- Rao, S. A. M., Arimappamagan, A., Pandey, P., Santosh, V., Hegde, A. S., et al. (2013) miR-219-5p inhibits receptor tyrosine kinase pathway by targeting EGFR in glioblastoma, *PLoS One*, **8**, e63164, doi: 10.1371/journal.pone.0063164.
- Guo, M., Peng, Y., Gao, A., Du, C., and Herman, J. G. (2019) Epigenetic heterogeneity in cancer, *Biomark Res.*, **7**, 23.
- Ghasemi, A., Fallah, S., and Ansari, M. (2016) MiR-153 as a tumor suppressor in glioblastoma multiforme is down-regulated by DNA methylation, *Clin. Lab.*, **62**, 573-580.
- Wang, L. Q., and Chim, C. S. (2015) DNA methylation of tumor-suppressor miRNA genes in chronic lymphocytic leukemia, *Epigenomics*, **7**, 461-473.
- Serra, P. L., and Esteller, M. (2012) DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer, *Oncogene*, **31**, 1609-1622.
- Pan, Z., Zhu, L. J., Li, Y. Q., Hao, L. Y., Yin, C., et al. (2014) Epigenetic modification of spinal miR-219 expression regulates chronic inflammation pain by targeting CaMKII $\gamma$ , *J. Neurosci.*, **16**, 9476-9483.
- Shi, F., Chen, X., Fu, A., Hansen, J., Stevens, R., et al. (2013) Aberrant DNA methylation of miR-219 promoter in long-term night shiftworkers, *Environ. Mol. Mutagen.*, **54**, 406-413.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 153-166.

24. Xia, P., Choi, A. H., Deng, Z., Yang, Y., Zhao, J., and Wang, Y. (2017) Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas, *Oncotarget*, **8**, 14147-14157.
25. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects epigenetic therapy, *Nature*, **429**, 457-463.
26. De, Sousa, Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E., and Vogel, C. (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels, *Mol. Biosyst.*, **5**, 1512-1526.
27. Svoronos, A. A., Engelman, D. M., and Slack, F. J. (2016) OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer, *Cancer Res.*, **76**, 3666-3670.

## EPIGENETIC MODIFICATION OF **microRNA-219-1** AND ITS ASSOCIATION WITH GLIOBLASTOMA MULTIFORME

A. Ghasemi<sup>1</sup>, A. Mohammadi<sup>2</sup>, and S. Fallah<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), 14176-13151 Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), 14496-14535 Tehran, Iran; E-mail: fallah.s@iums.ac.ir

MicroRNA-219-1 (miR-219-1) acts as a tumor suppressor in a variety of cancer but, the regulatory epigenetic mechanism involved in its gene expression level has not been studied. Using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) and bisulfite genomic sequencing technology, promoter methylation level of miR-219-1 and gene expression levels of miR-219-5p and miR-219-1-3p were determined respectively, in glioblastoma multiforme (GBM) ( $n = 31$ ), their adjacent normal tissues ( $n = 31$ ), and GBM U87 cell line. Following treatment of GBM U87 cells with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), miR-219-1 promoter methylation, their target mRNA and protein levels were determined by genomic bisulfite modification, real-time-PCR and ELISA techniques, respectively. Our results showed that gene expression levels of miR-219-5p and miR-219-1-3p were significantly lower in GBM patients relative to their adjacent normal tissues ( $p < 0.01$ ). MiR-219-1 promoter had a high level of methylation in GBM tissues ( $p < 0.01$ ) and a negative correlation was observed between miRNAs gene expression and methylation levels in GBM tissues ( $p < 0.01$ ). Treatment of GBM U87 cells by 5-aza-dC decreased the methylation level of miR-219-1, target mRNA and protein levels, cyclin A2 and mucin 4 (MUC4), and increased the expression levels of miR-219-5p and miR-219-1-3p ( $p < 0.01$ ). Using external miR-219-5p and miR-219-1-3p, the expression of cyclin A2 and MUC4 were suppressed and proliferative activities of the U87MG cell line was reduced ( $p < 0.01$ ). These findings suggested that DNA methylation has a crucial role in the regulation of miR-219-1 gene and hyper-methylated miR-219-1 may be involved in GBM pathogenesis.

**Keywords:** miR-219-1, epigenetic, GBM