

УЧАСТИЕ микроРНК В РЕГУЛЯЦИИ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КЛЕТОК РАКА ПРОСТАТЫ

© 2019 г. В. А. Тарасов¹, А. В. Набока¹, М. А. Махоткин¹, И. Е. Чикун³, М. Г. Тютякина¹,
Д. А. Чеботарев¹ *, Е. Н. Черкасова¹, М. И. Коган², М. Б. Чибичян², Д. Г. Матишов

¹Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, 344006 Россия

²Ростовский государственный медицинский университет, кафедра урологии и репродуктивного здоровья,
Ростов-на-Дону, 344006 Россия

³Южно-Российский государственный политехнический университет им. М.И. Платова,
Новочеркасск, 346428 Россия

*e-mail: last-che@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.06.2018 г.

После доработки 02.10.2018 г.

Принята к публикации 17.10.2018 г.

С помощью метода масштабного параллельного секвенирования получен спектр дифференциально экспрессирующихся микроРНК в клетках здоровых тканей простаты, гормон-зависимых опухолей рака простаты, а также в клеточных линиях LNCaP и DU145. В опухолях и клеточных линиях рака предстательной железы (РПЖ) идентифицирован набор микроРНК, экспрессия которых значимо изменялась по сравнению с экспрессией в нормальных тканях простаты. В опухолевых тканях выявлено 27 aberrantly экспрессирующихся микроРНК, из которых 10 также показали значимое изменение экспрессии в клетках LNCaP и DU145. При этом семь из них продемонстрировали однонаправленное изменение экспрессии во всех образцах опухолей, а также в клеточных линиях РПЖ. Экспрессия miR-148a изменялась в клетках DU145 в противоположном направлении по сравнению с клетками LNCaP и опухолями. Кроме того, направление экспрессии let-7c, let-7b, miR-99a, miR-125b-2, miR-100, miR-10a и miR-31, не показавших значимого изменения в клетках опухолей, менялось на противоположное при переходе от клеток LNCaP к клеткам DU145. Оказалось, что мишенью miR-148a, let-7b и микроРНК, включенных в кластер miR-99a/let-7c/miR-125b-2, экспрессия которых увеличивается в клетках LNCaP и снижается в DU145, является ген рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (*IGF1R*). Полученные в работе результаты дают основание полагать, что различие в действии микроРНК в клеточных линиях связано с их репрессивным влиянием на экспрессию *IGF1R* в клетках гормон-зависимой линии LNCaP и отсутствие этого влияния в клетках гормон-независимой линии DU145.

Ключевые слова: рак простаты, микроРНК, масштабное параллельное секвенирование, андрогеновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1.

DOI: 10.1134/S0016675819050138

МикроРНК представляют собой короткие, размером 19–23 нуклеотида, молекулы РНК, которые, ассоциируясь с белками-аргонатами (AGO1–4), образуют комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). Функция зрелой микроРНК заключается в распознавании комплексом RISC целевых информационных РНК. Взаимодействие этого комплекса с иРНК приводит либо к ее деградации, либо к подавлению трансляции [1, 2]. По разным оценкам, от 30 до 60% генов человека находится под прямым контролем микроРНК [3]. МикроРНК играют ключевую роль в регуляции основных генетических процессов, таких как клеточное деление [4], апоптоз [5], репарация ДНК

[6], дифференцировка [7, 8], ответ клетки на стрессовые воздействия [9].

Мутации и, как показано в последние 15–20 лет, эпигенетические нарушения онкогенов и генов-супрессоров опухоли приводят к злокачественному перерождению клеток различных органов, включая простату. В развитых странах рак предстательной железы занимает второе место среди онкологических заболеваний у мужчин. Хорошо известно, что клетки нормальной ткани, так же как и опухоли простаты, на ранних этапах развития нуждаются в андрогенах [10]. Однако в процессе развития злокачественная опухоль простаты часто приобретает способность к независимому от гормонов росту и прогрессии. Это ограничивает возможно-

Таблица 1. Клиническая информация об образцах ткани РПЖ

№	Возраст (лет)	Классификация по системе TNM			Оценка по шкале Глисона		Сумма по шкале Глисона	Андрогеновые рецепторы (+/–)	ПСА, нг/мл
		T	N	M	1	2			
1	61	T2	pN0	M0	3	4	7	+	8.7
2	55	T2a	pNx	M0	3	3	6	+	10.0
3	53	T1c	pNx	M0	3	3	6	+	12.0

сти гормональной терапии, которая широко используется при лечении рака простаты.

Несмотря на интенсивные исследования, механизм возникновения гормон-независимости опухолей простаты остается не до конца понятным и на сегодняшний день роль микроРНК в этом процессе не ясна. Ранее обнаружены микроРНК, экспрессия которых уменьшается в клетках гормон-независимых линий рака простаты по сравнению с клетками гормон-зависимых линий. К ним относятся микроРНК семейства miR-99 (miR-99a-99b-100) [11], miR-148a [12], let-7c [13] и другие, такие как miR-34a,с, miR-146a, miR-124, miR-31, miR-200b, miR-185 [14].

Известно, что IGF1R-сигнальный путь играет существенную роль в развитии рака простаты. Уровень экспрессии гена *IGF1R* в клетках гормон-независимой линии DU145 значительно превосходит таковой в клетках гормон-зависимой линии LNCaP [15, 16]. Однако роль микроРНК в гиперэкспрессии *IGF1R* в клетках DU145 остается не ясной. Данная работа посвящена анализу возможной роли микроРНК-опосредованной регуляции IGF1R в изменении зависимости клеток рака простаты от гормонов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы тканей. В работе использованы образцы гормон-зависимых опухолей локального рака предстательной железы (РПЖ) и нормальные ткани предстательной железы, предоставленные НИИ урологии и нефрологии Ростовского государственного медицинского университета. Нормальные ткани простаты, используемые в качестве контроля, были получены в ходе радикальной цистэктомии. Информированное добровольное согласие получено от всех пациентов, образцы которых были включены в исследование. Ни один из пациентов не получал гормональную терапию или химиотерапию до операции. Образцы тканей на 24 ч помещали в стабилизирующий раствор RNAlater (Ambion, США) сразу после операции, а затем измельчали и замораживали для последующего выделения РНК. Все образцы опухолей охарактеризованы морфологически в соответствии с системой TNM [17] и шкалой Глисона [18] (табл. 1). Исследование одобрено комитетом по этике Ро-

стовского государственного медицинского университета.

Иммуногистохимия. Для морфологической характеристики образцов ткани и оценки статуса андрогеновых рецепторов проводили иммуногистохимическое окрашивание. Из формалин-парафин-фиксированных образцов тканей получали пять последовательных срезов толщиной 4 мкм и монтировали на предварительно подготовленные стекла. Иммуноокрашивание проводили с использованием системы Ventana HX BenchMark™ (Ventana Medical Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Использовали моноклональные мышинные антитела против андрогенного рецептора в разведении 1/50 (клон AR441, DAKO, США). В качестве хромогенного субстрата использовали диаминобензидин. Для контрастной окраски использовали гематоксилин и эозин.

Клеточные линии. Клетки гормон-зависимой линии рака простаты LNCaP культивировали в среде RPMI-1460, а клетки гормон-независимых линий DU145 – в среде EMEM. К основной среде добавляли 10 объемных процентов эмбриональной бычьей сыворотки. Клетки культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ во флаконах площадью 75 см² (с интервалом времени между последовательными пересевами, равным 3 сут).

Выделение РНК. Для выделения тотальной РНК из образцов ткани простаты брали фрагмент объемом 0.5 см³, измельчали в жидком азоте и помещали в лизирующий буфер QIAzol (Qiagen, США). Для выделения РНК из клеточных линий использовали 2 × 10⁶ клеток. Тотальную РНК выделяли с использованием реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen, США) по протоколу производителя. Для выделения фракции малых РНК использовали miRNeasy Mini Kit (Qiagen, США), RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, США). Количественное определение тотальной РНК измеряли на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Life Science Technologies, США). Для качественного анализа тотальной РНК проводили электрофорез в денатурирующем 1%-ном агарозном геле с формальдегидом.

Масштабное параллельное секвенирование. Экспрессию микроРНК оценивали при помощи масштабного параллельного секвенирования на

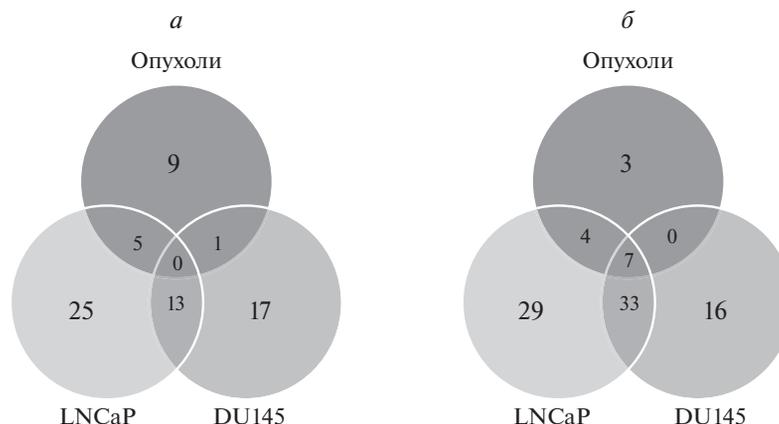


Рис. 1. МикроРНК, одинаково экспрессирующиеся в исследуемых линиях и опухолях РПЖ. *а* – пересечение спектров микроРНК с одинаково повышенной экспрессией в клетках LNCaP, DU145 и опухолях РПЖ; *б* – пересечение спектров микроРНК с одинаково сниженной экспрессией в клетках LNCaP, DU145 и опухолях РПЖ.

платформе Illumina. Для оценки первой повторности DU145 и LNCaP применяли систему MiSeq (Illumina Inc., США), для второй повторности этих клеточных линий и образцов опухолевых и нормальных тканей – HiSeq (Illumina Inc., США). В первой серии опытов для DU145 и LNCaP применяли систему MiSeq (Illumina Inc., США), для остальных случаев – HiSeq (Illumina Inc., США). Создание библиотеки кДНК и проведение масштабного параллельного секвенирования осуществляли в соответствии с методикой, описанной нами ранее [19].

Статистический анализ. При идентификации микроРНК секвенированные последовательности кДНК с помощью программы Bowtie, v. 1.2.0 [20] сравнивали с каноническими последовательностями микроРНК (miRBase, v. 21). При этом допускали замену одного нуклеотида в секвенированных последовательностях кДНК зрелой микроРНК. При нормализации уровня экспрессии сравниваемых вариантов использовали метод ТММ, реализованный в компьютерной программе edgeR [21]. В анализ включены микроРНК, зрелые формы которых представлены в анализируемой выборке не менее чем 25 копиями в пробе перевиваемой линии либо образцах ткани простаты и которые показали изменение экспрессии при доле ложных определений ($FDR \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием метода масштабного параллельного секвенирования получен спектр дифференциальной экспрессии микроРНК в клетках трех образцов гормон-зависимых опухолей РПЖ и трех образцов нормальной ткани простаты, а также в клетках линий LNCaP и DU145 в двух повторностях. Сравнивали экспрессию микроРНК в клетках каждого образца опухоли и в клетках

LNCaP и DU145 с экспрессией микроРНК в клетках каждого образца нормальной ткани простаты. В результате для опухолей проведено девять, а для линий LNCaP и DU145 – шесть сравнений для каждой. Анализируемые микроРНК показали статистически значимое ($FDR \leq 0.05$) одинаково направленное изменение экспрессии при каждом сравнении. 27 микроРНК (табл. 2) были идентифицированы в клетках опухолей, в то время как в клетках LNCaP – 116 микроРНК, а в клетках DU145 – 87 микроРНК (рис. 1).

Сравнение одинаково экспрессирующихся микроРНК в гормон-зависимых клетках опухолей и линий LNCaP показало, что одновременно изменилась экспрессия только 16 микроРНК. При этом у семи из них экспрессия изменялась в том же направлении и в клетках DU145 (табл. 3). Экспрессия этих микроРНК отражает изменения метаболизма в злокачественных клетках, не связанные с их зависимостью от гормонов.

Для четырех из них – miR-150-5p [22, 23], miR-223-3p [24], miR-378a-3p [25], miR-486-5p [26] – ранее показано участие в контроле рака простаты. Прямые данные об участии в регуляции канцерогенеза простаты трех других микроРНК, входящих в эту группу, отсутствуют. Однако известно, что miR-451a участвует в контроле колоректального рака и рака молочной железы [27, 28], miR-126-3p – рака груди [29] и рака щитовидной железы [30], miR-144-5p – рака мочевого пузыря [31].

В клеточных линиях у восьми микроРНК направление изменения экспрессии менялось на противоположное при переходе от клеток LNCaP к клеткам DU145, при этом у miR-148a уровень экспрессии менялся и в клетках опухолей (табл. 4). Для всех пяти микроРНК, показавших увеличение экспрессии в клетках LNCaP и соответствен-

Таблица 2. Изменение экспрессии микроРНК в клетках опухолей рака простаты

микроРНК	Опухоль 1			Опухоль 2			Опухоль 3		
	K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3
Уменьшение экспрессии*									
miR-126-3p	-1.9	-1.2	-2.6	-3.0	-2.5	-4.1	-2.3	-1.8	-3.2
miR-144-5p	-3.7	-3.3	-3.0	-3.0	-2.9	-2.6	-3.4	-3.2	-2.8
miR-150-5p	-2.0	-1.4	-1.6	-4.3	-4.0	-4.3	-2.8	-2.5	-2.6
miR-15b-5p	-1.8	-1.7	-2.2	-1.1	-1.2	-1.8	-1.9	-1.9	-2.4
miR-16-5p	-1.1	-0.7	-1.0	-1.6	-1.5	-2.0	-1.2	-1.0	-1.3
miR-21-5p	-0.8	-0.5	-1.0	-1.8	-1.8	-2.4	-1.5	-1.5	-1.9
miR-223-3p	-3.4	-3.7	-3.3	-3.0	-3.5	-3.2	-2.4	-2.9	-2.4
miR-301a-3p	-1.2	-0.6	-1.1	-1.2	-0.8	-1.5	-1.3	-1.0	-1.4
miR-378a-3p	-1.3	-1.2	-1.2	-1.1	-1.2	-1.4	-1.8	-1.9	-1.9
miR-378a-5p	-1.9	-2.2	-1.2	-4.0	-4.5	-3.7	-3.4	-3.9	-2.9
miR-424-5p	-1.3	-0.9	-2.1	-1.9	-1.7	-3.0	-1.8	-1.6	-2.8
miR-451a	-1.8	-1.9	-3.6	-2.4	-2.8	-4.6	-3.1	-3.5	-5.1
miR-454-3p	-1.0	-0.7	-0.9	-1.1	-1.0	-1.3	-1.0	-0.9	-1.0
miR-486-5p	-4.0	-3.9	-2.8	-2.8	-3.0	-2.0	-4.1	-4.2	-3.1
Увеличение экспрессии*									
miR-1260a	2.1	1.9	2.6	1.5	1.1	1.6	1.7	1.4	2.0
miR-143-3p	2.6	3.2	5.5	3.7	4.0	6.3	3.1	3.5	5.9
miR-148a-3p	4.6	4.4	3.4	3.7	3.4	2.2	2.0	1.6	0.6
miR-148a-5p	1.8	1.8	3.4	2.5	2.2	3.7	1.4	1.1	2.8
miR-148b-3p	2.7	2.9	1.3	3.0	3.0	1.3	2.2	2.2	0.7
miR-152-3p	0.9	1.0	0.9	2.3	2.2	1.9	1.9	1.7	1.7
miR-196b-5p	2.8	3.5	3.8	3.1	3.5	3.7	3.0	3.5	3.8
miR-21-3p	4.3	7.4	1.0	5.5	8.4	1.8	4.5	7.4	1.0
miR-26b-5p	1.2	1.9	2.0	1.1	1.5	1.5	0.7	1.2	1.4
miR-30a-3p	2.2	2.8	2.4	3.6	3.9	3.5	1.8	2.1	1.8
miR-30c-2-3p	3.5	4.0	3.8	5.3	5.6	5.3	3.8	4.1	3.9
miR-582-3p	5.2	5.2	4.4	5.7	5.4	4.5	3.4	3.1	2.4
miR-99a-3p	2.2	2.7	4.1	3.4	3.7	5.0	2.4	2.7	4.2

* Двоичный логарифм отношения уровня экспрессии микроРНК в клетках опухолей простаты к таковому в нормальной ткани; K1 – контроль 1, K2 – контроль 2, K3 – контроль 3.

но ее уменьшение в клетках DU145, мишенью является ген *IGF1R*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевую роль в развитии рака простаты играет андрогенный рецептор (AR), взаимодействие которого с андрогенами приводит к его активации [32, 33]. Активированный AR приобретает способность перемещаться из цитоплазмы в ядро клетки [34]. Его взаимодействие с AREs (androgen response elements) – каноническими последовательностями ДНК в промоторных участках генов – приводит к подавлению или активации их тран-

скрипционной активности [35]. Однако активация AR и его перемещение в ядро клетки может происходить и в отсутствие андрогенов при включении сигнального пути IGF-1 [36]. Мишенями андрогенного рецептора являются свыше 400 генов [37]. К ним относится и ген микроРНК miR-148a [38], направление экспрессии которой меняется на противоположное при переходе от клеток LNCaP к DU145 (табл. 4). Прямыми мишенями этой микроРНК являются ДНК-метилтрансферазы DNMT3b [39, 40] и DNMT1 [41], отвечающие за метилирование *de novo* и поддерживающие метилирование соответственно (рис. 2).

Таблица 3. Однонаправленное изменение экспрессии микроРНК в клетках опухолей и обеих клеточных линий РПЖ

микроРНК	Опухоли**	Клеточная линия											
		LNCaP						DU145					
		эксперимент I			эксперимент II			эксперимент I			эксперимент II		
		K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3
Изменение экспрессии микроРНК*													
miR-126-3p	↓	-4.6	-4.1	-5.1	-6.2	-5.4	-7.0	-4.2	-3.7	-4.8	-5.9	-5.4	-6.8
miR-144-5p	↓	-8.8	-8.0	-7.0	-10.0	-9.5	-9.1	-8.7	-7.9	-6.9	-10.0	-9.7	-9.2
miR-150-5p	↓	-11.7	-10.7	-10.1	-12.9	-12.2	-12.3	-11.6	-10.6	-10.1	-12.9	-12.4	-12.3
miR-223-3p	↓	-10.8	-10.6	-9.5	-12.1	-12.1	-11.7	-10.8	-10.6	-9.4	-12.1	-12.3	-11.7
miR-378a-3p	↓	-3.4	-3.5	-3.1	-3.3	-3.1	-3.4	-2.4	-2.5	-2.2	-2.2	-2.3	-2.4
miR-451a	↓	-13.7	-13.4	-14.3	-14.9	-14.9	-16.5	-13.6	-13.3	-14.3	-14.9	-15.0	-16.5
miR-486-5p	↓	-2.2	-2.3	-0.8	-2.7	-2.6	-1.7	-4.8	-4.9	-3.5	-5.6	-5.7	-4.6

* Двоичный логарифм отношения экспрессий микроРНК в клетках линий LNCaP и DU145 к таковому в нормальной ткани.
 ** Стрелка указывает направление изменения экспрессии микроРНК в клетках опухолей простаты. K1 – контроль 1, K2 – контроль 2, K3 – контроль 3.

Таблица 4. Разнонаправленное изменение экспрессии микроРНК в клетках опухолей и обеих клеточных линий РПЖ

микроРНК	Опухоли**	Клеточная линия											
		LNCaP						DU145					
		эксперимент I			эксперимент II			эксперимент I			эксперимент II		
		K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3
Изменение экспрессии микроРНК*													
miR-99a-5p	н.з.	1.2	0.8	6.5	1.6	1.5	6.5	-8.0	-8.4	-2.8	-8.1	-8.5	-3.3
let-7c-5p	н.з.	2.0	2.0	6.7	2.5	2.7	6.8	-8.9	-8.9	-4.3	-7.4	-7.4	-3.1
miR-125b-2-3p	н.з.	3.2	3.5	6.6	3.2	3.7	6.3	-8.2	-7.3	н.з.	-6.6	-6.3	н.з.
let-7b-5p	н.з.	2.4	2.3	2.1	2.0	2.1	1.3	-1.1	-1.2	-1.5	-0.7	-0.8	-1.5
miR-148a-3p	↑	3.1	2.8	2.1	1.1	1.1	н.з.	-0.6	-1.0	-1.7	-3.1	-3.4	-4.5
miR-10a-5p	н.з.	-2.0	-2.0	-1.2	-2.4	-2.2	-2.0	2.0	2.0	2.7	1.7	1.6	2.0
miR-100-3p	н.з.	-10.9	-10.0	-8.5	-12.2	-11.5	-10.6	4.3	4.5	5.7	1.0	1.3	2.1
miR-31-5p	н.з.	-9.2	-8.9	-12.0	-6.2	-6.2	-10.3	5.6	5.3	1.8	4.9	4.6	0.7

* Двоичный логарифм отношения экспрессий микроРНК в клетках линий LNCaP и DU145 к таковому в нормальной ткани.
 ** Стрелка указывает направление изменения экспрессии микроРНК в клетках опухолей простаты. K1 – контроль 1, K2 – контроль 2, K3 – контроль 3; н.з. – отличия не значимы.

Кроме того, по данным miRDB (<http://mirdb.org>) и TargetScan (<http://www.targetscan.org>) к предсказанным мишеням miR-148a относится и ген *KDM2B*, кодирующий лизин-специфическую деметилазу 2B. *KDM2B* входит в состав поликомб-комплекса 1 (PRC1). Ее связывание с полностью не метилированной ДНК CpG-островков приводит к моноубиквитинированию лизина в

положении 119, гистона 2A (H2AK119 Ub1) и рекрутированию к месту связывания поликомб-комплекса 2 (PRC2), компонентом которого является гистон-метилтрансфераза 2 (EZH2). Это приводит к триметилированию лизина в 27-м положении гистона 3 (H3K27me3) и, соответственно, к гистон-зависимому подавлению транскрипционной активности генов, промоторы которых

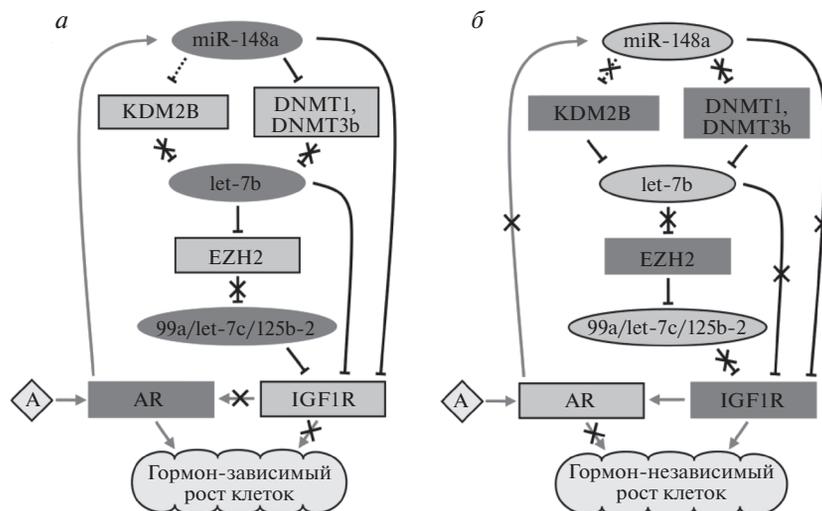


Рис. 2. МикроРНК-зависимая регуляция экспрессии IGF1R в клетках линий LNCaP и DU145. *а* – схема регуляции в клетках LNCaP; *б* – схема регуляции в клетках DU145. \blacktriangledown – усиление экспрессии гена или активация белка; \downarrow – подавление экспрессии; \times – отсутствие (ослабление) регулирующего действия; \square – увеличенная экспрессия гена; \blacksquare – уменьшенная экспрессия гена; \vdots – предсказанная регуляция; $|$ – верифицированная регуляция.

содержат CpG-островки. Кроме того, H3K27me3 является молекулярной меткой для метилирования ДНК *de novo* [42].

Известно, что промоторный участок гена микроРНК *let-7b*, мишенью которой является гистон-метилтрансфераза *EZH2* [43], содержит CpG-островки и его транскрипция зависит от уровня метилирования ДНК [44]. На примере эпигенетической регуляции деления клеток эмбриональных фибробластов мыши [43] и миелоидных клеточных линий [45] показано, что активация *KDM2B* приводит к активации *EZH2* и уменьшению экспрессии *let-7b*, и, напротив, уменьшение экспрессии *KDM2B* сопровождается уменьшением экспрессии *EZH2* и увеличением экспрессии *let-7b*. В свою очередь Сан и соавт. [46] показали, что активность *EZH2* подавляет активность гена *MIR99AHG*. Транскрипт этого гена содержит кластер микроРНК *miR-99a/let-7c/miR-125b-2*. Мишенью микроРНК, входящих в этот кластер, так же как *miR-148a* и *let-7b*, является ген *IGF1R*.

Для *miR-148a*, показавшей увеличение экспрессии в клетках LNCaP, мы также наблюдаем увеличение экспрессии в гормон-зависимых клетках опухолей. Различия в экспрессии микроРНК в клетках LNCaP и клетках опухолей касаются *let-7c*, *let-7b*, *miR-99a* и *miR-125b*. Природа этих различий остается не ясной, однако можно полагать, что она связана с изменениями в экспрессии генов, белки которых участвуют в дифференциальном созревании микроРНК, например, LIN – 28 [13, 47]. В настоящее время показано, что *IGF1R* играет существенную роль в развитии гормональной независимости клеток

рака простаты [48]. Это может быть, в частности, связано с независимой от андрогенов активацией андрогенных рецепторов [36]. Однако в работе Алимиди и соавт. [49] показано, что в гормон-независимых клетках DU145 и PC3 снижена активность гена *AR* по сравнению с таковой в гормон-зависимых клетках LNCaP. В этой связи не исключено, что в основе деления и выживаемости гормон-независимых клеток, культивируемых *in vitro*, лежит зависимый от *IGF1R*, но не от *AR*, обходной сигнальный путь [50, 51].

Полученные нами результаты дают основания полагать, что различия в действии микроРНК в двух изученных клеточных линиях в основном связаны с их репрессивным влиянием на экспрессию *IGF1R* в клетках гормон-зависимой линии LNCaP и отсутствием этого влияния в клетках гормон-независимой линии DU145.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ЮНЦ РАН, номер государственной регистрации 01201363192.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin S., Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2015. V. 15. № 6. P. 321–333. doi 10.1038/nrc3932
2. Kim Y.K., Kim B., Kim V.N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 13. E1881–1889. doi 10.1073/pnas.1602532113
3. Friedman R.C., Farh K.K.H., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // Genome Res. 2009. V. 19. № 1. P. 92–105. doi 10.1101/gr.082701.108

4. *Shenoy A., Blemloch R.H.* Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 9. P. 565–576. doi 10.1038/nrm3854
5. *Lima R.T., Busacca S., Almeida G.M. et al.* MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer // *Eur. J. Cancer.* 2011. V. 47. № 2. P. 163–174. doi 10.1016/j.ejca.2010.11.005
6. *Landau D.A., Slack F.J.* MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability, and DNA repair // *Semin. Oncol.* 2011. V. 38. № 6. P. 743–751. doi 10.1053/j.seminoncol.2011.08.003
7. *Ivey K.N., Srivastava D.* MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 7. № 1. P. 36–41. doi 10.1016/j.stem.2010.06.012
8. *Turner M.L., Schnorfeil F.M., Brocker T.* MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function // *J. Immunol.* 2011. V. 187. № 8. P. 3911–3917. doi 10.4049/jimmunol.1101137
9. *Leung A.K., Sharp P.A.* MicroRNA functions in stress responses // *Mol. Cell.* 2010. V. 40. № 2. P. 205–215. doi 10.1016/j.molcel.2010.09.027
10. *Cucchiara V., Yang J.C., Mirone V. et al.* Epigenomic regulation of androgen receptor signaling: potential role in prostate cancer therapy // *Cancers.* 2017. V. 9. № 1. P. 9. doi 10.3390/cancers9010009
11. *Sun D., Lee Y.S., Malhotra A. et al.* miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation // *Cancer Res.* 2011. V. 71. № 4. P. 1313–1324. doi 10.1158/0008-5472.can-10-1031
12. *Fujita Y., Kojima K., Ohhashi R. et al.* miR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 25. P. 19076–19084. doi 10.1074/jbc.M109.079525
13. *Nadiminty N., Tummala R., Lou W. et al.* MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 2. P. 1527–1537. doi 10.1074/jbc.M111.278705
14. *Li F., Mahato R.I.* MicroRNAs and drug resistance in prostate cancers // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. № 8. P. 2539–2552. doi 10.1021/mp500099g
15. *Iwamura M., Sluss P.M., Casamento J.B., Cockett A.T.* Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines // *Prostate.* 1993. V. 22. № 3. P. 243–252. doi 10.1002/pros.2990220307
16. *Rochester M.A., Riedemann J., Hellawell G.O. et al.* Silencing of the IGF1R gene enhances sensitivity to DNA-damaging agents in both PTEN wild-type and mutant human prostate cancer // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. № 1. P. 90–100. doi 10.1038/sj.cgt
17. *Schröder F.H., Hermanek P., Denis L. et al.* The TNM classification of prostate cancer // *Prostate Suppl.* 1992. V. 21. № 4. P. 129–138. doi 10.1002/pros.2990210521
18. *Mellinger G.T., Gleason D., Bailar J.* The histology and prognosis of prostatic cancer // *J. Urol.* 1967. V. 97. № 2. P. 331–337. doi 10.1016/S0022-5347(17)63039-8
19. *Тарасов В.А., Бойко Н.В., Махоткин М.А. и др.* Зависимость индуцированной митомицином С аберрантной экспрессии микроРНК от метилирования ДНК // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 11. С. 1233–1240. doi 10.7868/S0016675816110151
20. *Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome // *Genome Biol.* 2009. V. 10. № 3. R25. doi 10.1186/gb-2009-10-3-r25
21. *Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K.* edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 1. P. 139–140. doi 10.1093/bioinformatics/btp616
22. *Dezhong L., Xiaoyi Z., Xianlian L. et al.* miR-150 is a factor of survival in prostate cancer patients // *J. BUON.* 2015. V. 20. № 1. P. 173–179.
23. *Liu D.Z., Zhang H.Y., Long X.L. et al.* MIR-150 promotes prostate cancer stem cell development via suppressing p27Kip1 // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2015. V. 19. № 22. P. 4344–4352.
24. *Kurozumi A., Goto Y., Matsushita R. et al.* Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer // *Cancer Sci.* 2016. V. 107. № 1. P. 84–94. doi 10.1111/cas.12842
25. *Avgeris M., Stravodimos K., Scorilas A.* Loss of miR-378 in prostate cancer, a common regulator of KLK2 and KLK4, correlates with aggressive disease phenotype and predicts the short-term relapse of the patients // *Biol. Chem.* 2014. V. 395. № 9. P. 1095–1104. doi 10.1515/hsz-2014-0150
26. *Zhang X., Zhang T., Yang K. et al.* miR-486-5p suppresses prostate cancer metastasis by targeting snail and regulating epithelial–mesenchymal transition // *Oncotargets Ther.* 2016. V. 9. P. 6909–6914. doi 10.2147/ott.s117338
27. *Bitarte N., Bandres E., Boni V. et al.* MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells // *Stem Cells.* 2011. V. 29. № 11. P. 1661–1671. doi 10.1002/stem.741
28. *Kovalchuk O., Filkowski J., Meservy J. et al.* Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin // *Mol. Cancer Ther.* 2008. V. 7. № 7. P. 2152–2159. doi 10.1158/1535-7163.mct-08-0021
29. *Zhu N., Zhang D., Xie H. et al.* Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2 // *Mol. Cell. Biochem.* 2011. V. 351. № 1–2. P. 157–164. doi 10.1007/s11010-011-0723-7
30. *Xiong Y., Kotian S., Zeiger M.A. et al.* miR-126-3p inhibits thyroid cancer cell growth and metastasis, and is associated with aggressive thyroid cancer // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 8. e0130496. doi 10.1371/journal.pone.0130496
31. *Matsushita R., Seki N., Chiyomaru T. et al.* Tumour-suppressive microRNA-144-5p directly targets CCNE1/2 as potential prognostic markers in bladder cancer // *Br.*

- J. Cancer. 2015. V. 113. № 2. P. 282–289. doi 10.1038/bjc.2015.195
32. Liu L.L., Xie N., Sun S. et al. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 24. P. 3140–3150. doi 10.1038/onc.2013.284
 33. Liao R.S., Ma S., Miao L. et al. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation // *Transl. Androl. Urol.* 2013. V. 2. № 3. P. 187–196. doi 10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07
 34. Watson P.A., Arora V.K., Sawyers C.L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer // *Nat. Rev. Cancer*. 2015. V. 15. № 12. P. 701–711. doi 10.1038/nrc4016
 35. Denayer S., Helsen C., Thorrez L. et al. The rules of DNA recognition by the androgen receptor // *Mol. Endocrinol.* 2010. V. 24. № 5. P. 898–913. doi 10.1210/me.2009-0310
 36. Wu J.D., Haugk K., Woodke L. et al. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression // *J. Cell. Biochem.* 2006. V. 99. № 2. P. 392–401. doi 10.1002/jcb.20929
 37. Liu S., Kumari S., Hu Q. et al. A comprehensive analysis of coregulator recruitment, androgen receptor function and gene expression in prostate cancer // *eLife*. 2017. V. 6. e28482. doi 10.7554/eLife.28482
 38. Hamilton M.P., Rajapakshe K.I., Bader D.A. et al. The landscape of microRNA targeting in prostate cancer defined by AGO-PAR-CLIP // *Neoplasia*. 2016. V. 18. № 6. P. 356–370. doi 10.1016/j.neo.2016.04.008
 39. Li Y., Deng X., Zeng X., Peng X. The role of mir-148a in cancer // *J. Cancer*. 2016. V. 7. № 10. P. 1233–1241. doi 10.7150/jca.14616
 40. Duursma A.M., Kedde M., Schrier M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region // *RNA*. 2008. V. 14. № 5. P. 872–877. doi 10.1261/rna.972008
 41. Braconi C., Huang N., Patel T. MicroRNA dependent regulation of DNMT-1 and tumor suppressor gene expression by Interleukin-6 in human malignant cholangiocytes // *Hepatology*. 2010. V. 51. № 3. P. 881–890. doi 10.1002/hep.23381
 42. Wang W., Qin J.J., Voruganti S. et al. Polycomb group (PcG) proteins and human cancers: multifaceted functions and therapeutic implications // *Med. Res. Rev.* 2015. V. 35. № 6. P. 1220–1267. doi 10.1002/med.21358
 43. Tzatsos A., Paskaleva P., Lympieri S. et al. Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 38. P. 33061–33069. doi 10.1074/jbc.M111.257667
 44. Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 1. e54398. doi 10.1371/journal.pone.0054398
 45. Karopongse E., Yeung C., Byon J. et al. The KDM2B-let-7b-EZH2 axis in myelodysplastic syndromes as a target for combined epigenetic therapy // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 9. e107817. doi 10.1371/journal.pone.0107817
 46. Sun D., Layer R., Mueller A.C. et al. Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 11. P. 1448–1457. doi 10.1038/onc.2013.77
 47. Nadiminty N., Tummala R., Lou W. et al. MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e32832. doi 10.1371/journal.pone.0032832
 48. Denduluri S.K., Idowu O., Wang Z. et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance // *Genes Dis.* 2015. V. 2. № 1. P. 13–25. doi 10.1016/j.gendis.2014.10.004
 49. Alimirah F., Chen J., Basrawala Z. et al. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 9. P. 2294–2300. doi 10.1016/j.febslet.2006.03.041
 50. Ferraldeschi R., Welti J., Luo J. et al. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects // *Oncogene*. 2015. V. 34. № 14. P. 1745–1757. doi 10.1038/onc.2014.115
 51. Edwards J., Bartlett J. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Pt 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways // *BJU Int.* 2005. V. 95. № 9. P. 1327–1335. doi 10.1111/j.1464-410X.2005.05527.x

The Influence of microRNAs in Regulation of Hormone Dependence in Prostate Cancer Cells

V. A. Tarasov^a, A. V. Naboka^a, M. A. Makhotkin^a, I. E. Chikunov^c, M. G. Tyutyakina^a,
D. A. Chebotarev^{a, *}, E. N. Cherkasova^a, M. I. Kogan^b, M. B. Chibichyan^b, and D. G. Matishov[†]

^a*Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

^b*Rostov State Medical University, Department of Urology and Reproductive Health, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

^c*Platov South-Russian State Polytechnic University, Novocherkassk, 346428 Russia*

*e-mail: last-che@yandex.ru

A spectrum of differentially expressed microRNAs in normal healthy prostate tissues, hormone-dependent prostate cancer tumours, as well as in LNCaP and DU145 cell lines was revealed by means of the massively

parallel sequencing method. A set of microRNAs in tumours and prostate cancer (PCa) cell lines was identified demonstrating the significant changes in expression compared with that in normal prostate tissues. 27 aberrantly expressed microRNAs were revealed in tumour tissues, while 10 of them showed the significant changes in expression in LNCaP and DU145 cells. And herewith, 7 of them demonstrated the unidirectional change in the expression in all the tumour samples and also in the PCa cell lines. MiR-148a changed their expression in DU145 cells in the opposite direction compared with that in LNCaP cells and tumours. In addition, the direction of the change in expression of let-7c, let-7b, miR-99a, miR-125b-2, miR-100, miR-10a and miR-31 was reversed in DU145 cells compared with LNCaP cells. However, these microRNAs exhibited no significant changes in expression in tumours. It has turned out that the total target of miR-148a, let-7b and microRNAs, included into mir-99a/let-7c/mir-125b-2 cluster, the expression of which increased in LNCaP cells and reduced in DU145 cells, is the insulin-like growth factor receptor gene 1 (*IGF1R*). The obtained data allow to assume that the differences in microRNAs' action in cell lines are connected with their repressive influence on *IGF1R*'s expression in hormone-sensitive LNCaP cells and an absence of such influence in hormone-independent DU145 cell line.

Keywords: prostate cancer, microRNA, massively parallel sequencing, androgen receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor.