

## УЧАСТИЕ микроРНК В РЕГУЛЯЦИИ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК HeLa И DU145

© 2019 г. Д. А. Чеботарев<sup>1</sup>, \*, М. А. Махоткин<sup>1</sup>, А. В. Набока<sup>1</sup>, М. Г. Тютякина<sup>1</sup>,  
Е. Н. Черкасова<sup>1</sup>, В. А. Тарасов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, 344006 Россия

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

Поступила в редакцию 07.12.2018 г.

После доработки 04.03.2019 г.

Принята к публикации 02.04.2019 г.

Используя метод масштабного параллельного секвенирования получен спектр дифференциальной экспрессии микроРНК после радиационного воздействия в дозе 4 Гр в клетках исходных и радиорезистентных вариантов линий HeLa и DU145. Сравнительный анализ позволил идентифицировать группу микроРНК, aberrantная экспрессия которых отражает сохраняющиеся в ряду клеточных поколений изменения метаболизма клеток радиорезистентных вариантов по сравнению с исходными. Полученные результаты дают основания полагать, что роль микроРНК связана с обеспечением функционального взаимодействия между ДНК-метилтрансферазами, транскрипционным регулятором Мус, а также фосфатазой PTEN в регуляции активности сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK/ERK. Это может лежать в основе различий в реализации радиорезистентности в клетках HeLa и DU145.

**Ключевые слова:** микроРНК, масштабное параллельное секвенирование, радиорезистентность, апоптоз, клеточный цикл, рак, DU145, HeLa.

**DOI:** 10.1134/S0016675819090042

После открытия процесса репарации ДНК в начале на *Escherichia coli*, а затем и на клетках млекопитающих стало ясно, что мутагенный и летальный эффект определяется не только числом и типом возникающих при действии мутагена первичных повреждений ДНК, но и вероятностью их реализации в необратимую форму мутации либо летали. Позднее были обнаружены и другие процессы, влияющие на “судьбу” первичных повреждений ДНК. К их числу в первую очередь относят апоптоз и процессы, протекающие в контрольных точках клеточного цикла на границах между предсинтетической и синтетической фазами и постсинтетической фазой и митозом, а также в пределах синтетической фазы [1]. При действии ионизирующей радиации основным типом первичных повреждений ДНК, лежащих в основе клеточной гибели, являются двунитевые разрывы [2]. Возникновение в геноме отдельных повреждений ДНК, наряду с формированием мутационных изменений, индуцирует клеточный ответ, в контроле которого участвуют сотни генов. При этом центральную роль в этом процессе играют две фосфопроteinкиназы — ATM и DNA-PK, которые являются трансдукторами сигнала от сенсоров повреждения к генам-эффекторам, непосредственно участвующим в процессах, связанных со

стабильностью генома — репарации ДНК, задержке клеточного цикла и апоптозе.

В течение последних 10 лет было показано, что в ответ клетки на радиационное воздействие вовлечены гены микроРНК и гены, участвующие в их дифференциальном созревании [3]. МикроРНК представляют собой небольшие однонитчатые РНК размером 19–22 нуклеотида, которые, “загружаясь” в белок AGO2, формируют ядро комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) — РНК-индуцируемый комплекс выключения гена. Функция микроРНК в этом комплексе заключается в распознавании целевых молекул и РНК для их последующей деградации либо подавления их трансляции. В настоящее время показано, что индукция двунитевых разрывов ДНК приводит к изменению экспрессии целого ряда микроРНК, в том числе и тех, чьи гены-мишени включены в контроль репарации ДНК, апоптоза и прохождения клеточного цикла [4]. На разных моделях в системах как *in vitro*, так и *in vivo* в настоящее время идентифицированы десятки микроРНК, участвующие в контроле радиорезистентности. К их числу относят miR-125b-5p [5], miR-17-3p [6], miR-20a-5p [7], miR-29a-3p [8], miR-101-3p [9]. Однако набор микроРНК, характеризующих ра-

диорезистентность, меняется при переходе от одного типа клеток к другому. В этой связи целью данной работы являлась идентификация и анализ механизма действия микроРНК, регулирующих радиорезистентность клеток рака простаты на модели андроген-независимой линии DU145 и клеток рака шейки матки на модели линии HeLa.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** В работе использовали клеточные линии HeLa и DU145, предоставленные лабораторией цитоскелета НИИ ФХБ МГУ им. М.В. Ломоносова, а также полученные нами ранее их радиорезистентные варианты HeLa-RR и DU145-RR [10]. Клетки культивировали в среде Игла MEM (ООО БиолоТ, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (NuClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина при 37°C в 5%-ной атмосфере CO<sub>2</sub>.

**Клоногенный тест.** Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, засеивали в 6-луночные планшеты. Плотность засева определяли по результатам предварительных опытов по облучению клеток и ожидаемому количеству колоний, приблизительно равным 50. Облучение проводили через 6 ч после засева в дозе 0, 2, 4 и 6 Гр на планшет. Для формирования колоний планшеты инкубировали 10 дней при температуре 37°C в 5%-ной атмосфере CO<sub>2</sub>. Через 10 дней колонии фиксировали 70%-ным этанолом и окрашивали 1%-ным раствором метиленового синего. Учитывали колонии, образованные не менее чем 50 клетками.

**Выделение РНК.** Для выделения РНК из клеточных линий использовали  $2 \times 10^6$  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 Min Elute Cleanup Kit (Qiagen, США). Количественное определение тотальной РНК проводили 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 платформе HiSeq (Illumina Inc., США). Создание библиотеки кДНК и проведение масштабного параллельного секвенирования осуществляли в соответствии с методикой, описанной нами ранее [11].

**Биоинформатика и статистический анализ.** Идентификацию микроРНК в секвенированных последовательностях кДНК выполняли путем сравнения их с каноническими последовательно-

стями зрелых микроРНК (miRBase, v. 21) с помощью программы Bowtie, v. 1.2.0 [12]. При этом соответствующими принимали риды, равные микроРНК по длине последовательности кДНК, с возможной заменой одного нуклеотида. Анализ различий профилей экспрессии микроРНК проводили с использованием модификации точного метода Фишера, реализованного в статистическом пакете edgeR [13]. Для нормализации уровня экспрессии сравниваемых вариантов использовали реализованный там же метод ТММ, показатель изменчивости BCV принимали равным 0.1. В анализ были включены микроРНК, представленные хотя бы в одной из сравниваемых секвенированных библиотек кДНК 25 и более ридами. Статистически значимыми принимали изменения экспрессии при уровне FDR  $\leq 0.05$ .

Стандартное отклонение в каждой из трех повторностей при проведении клоногенного теста рассчитывали в нормальном приближении как

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$$
, где  $p = \frac{n}{N}$ ,  $n$  – число колоний,  $N$  – число засеянных клеток. При отсутствии значимых различий в повторностях результаты, полученные в каждой из них, объединяли в общую выборку. При оценке значимости различий результатов клоногенного теста использовали  $t$ -критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Радиорезистентные варианты HeLa и DU145*

Для получения радиорезистентных вариантов клеточных линий использовали метод дробного многократного облучения. При этом накопленная доза составила 44 Гр, которые подавались фракциями по 4 Гр каждая с интервалом времени между последовательными облучениями, равным одной неделе. Радиорезистентность исходных и полученных в результате многократного облучения клеточных линий оценивали с помощью клоногенного теста, позволяющего учитывать способность отдельных клеток к формированию колоний.

В табл. 1 представлены результаты изменения относительной способности формировать клоны после радиационного воздействия для клеток HeLa, HeLa-RR, DU145 и DU145-RR. Оказалось, что в клетках HeLa радиорезистентность по способности формировать колонии в полученных радиорезистентных вариантах превосходит таковую в исходных при всех дозах облучения. Однако в случае клеток линии DU145 значимое различие радиорезистентности по этому критерию наблюдалось лишь при дозе 6 Гр.

**Таблица 1.** Индуцированное радиацией изменение клоногенности клеток

Вариант линии	Доза, Гр	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	$\alpha$	$S\alpha$	<i>t</i>	<i>p</i>
HeLa								
Исходная	2	180	66	36.7	0.53	0.06	2.95	<0.01
Резистентная		210	101	48.1	0.82	0.08		
Исходная	4	350	44	12.6	0.18	0.03	4.76	<0.01
Резистентная		375	97	25.9	0.44	0.05		
Исходная	6	750	24	3.2	0.05	0.01	3.43	<0.01
Резистентная		750	53	7.1	0.12	0.02		
Исходная	Контроль	150	103	68.7	1.00	–		
Резистентная		180	105	58.3	1.00	–		
DU145								
Исходная	2	450	76	16.9	0.60	0.08	1.31	>0.05
Резистентная		600	136	22.7	0.75	0.08		
Исходная	4	900	83	9.2	0.33	0.05	1.12	>0.05
Резистентная		1200	146	12.2	0.40	0.04		
Исходная	6	1800	67	3.7	0.13	0.02	3.06	<0.01
Резистентная		3000	202	6.7	0.22	0.02		
Исходная	Контроль	300	84	28.0	1.00	–		
Резистентная		450	136	30.2	1.00	–		

Примечание. *N* – число засеянных клеток; *n* – число сформированных колоний; *v* – частота формирования колоний в пересчете на 100 клеток;  $\alpha$  – изменение частоты формирования колоний под действием радиации;  $S\alpha$  – стандартное отклонение изменения частоты формирования колоний под воздействием радиации; *t* – значение критерия Стьюдента.

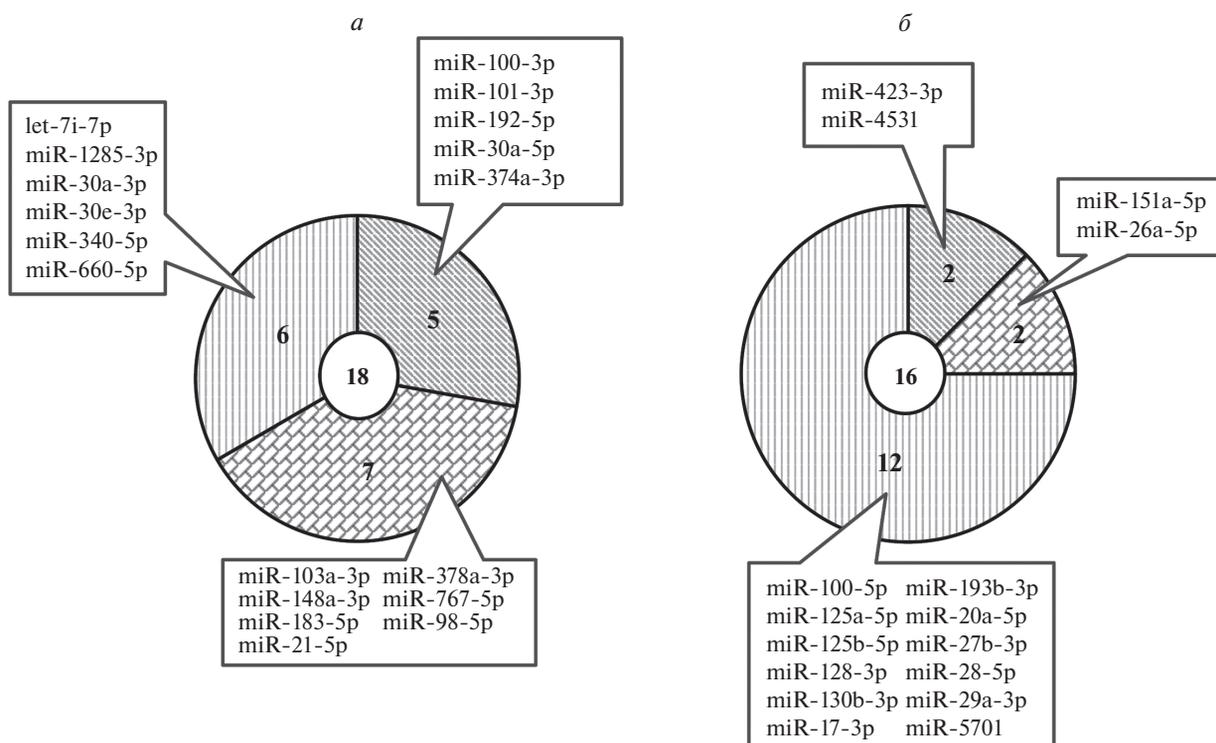
**Таблица 2.** Полное число секвенированных последовательностей малых РНК, включая микроРНК

Линия	Вариант библиотеки	Полное число ридов малых РНК	Число ридов микроРНК	Число идентифицированных микроРНК
DU145	Контроль	6509850	1705031	533
	1-е сутки	8484595	1775606	551
	8-е сутки	6812880	1005001	498
DU145-RR	Контроль	7199946	1359095	519
	1-е сутки	4226138	822838	474
	8-е сутки	5701651	1004343	420
HeLa	Контроль	13359645	844260	473
	1-е сутки	12089590	896864	491
	8-е сутки	5510198	1227758	505
HeLa-RR	Контроль	10112680	637876	466
	1-е сутки	9566078	441146	438
	8-е сутки	5360570	781912	459

#### Масштабное параллельное секвенирование

Для анализа дифференциальной экспрессии микроРНК в исходном и радиорезистентном вариантах клеток HeLa и DU145 использовали платформу Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., США). В табл. 2 представлены числа секвенированных нуклеотидных последовательностей

кДНК-копий (ридов) малых РНК, включая число идентифицированных среди них копий микроРНК. При идентификации молекул микроРНК использовали базу данных miRBase v. 21. При этом к числу микроРНК относили последовательности, имеющие каноническую длину и не более одной замены нуклеотида. В дальнейший



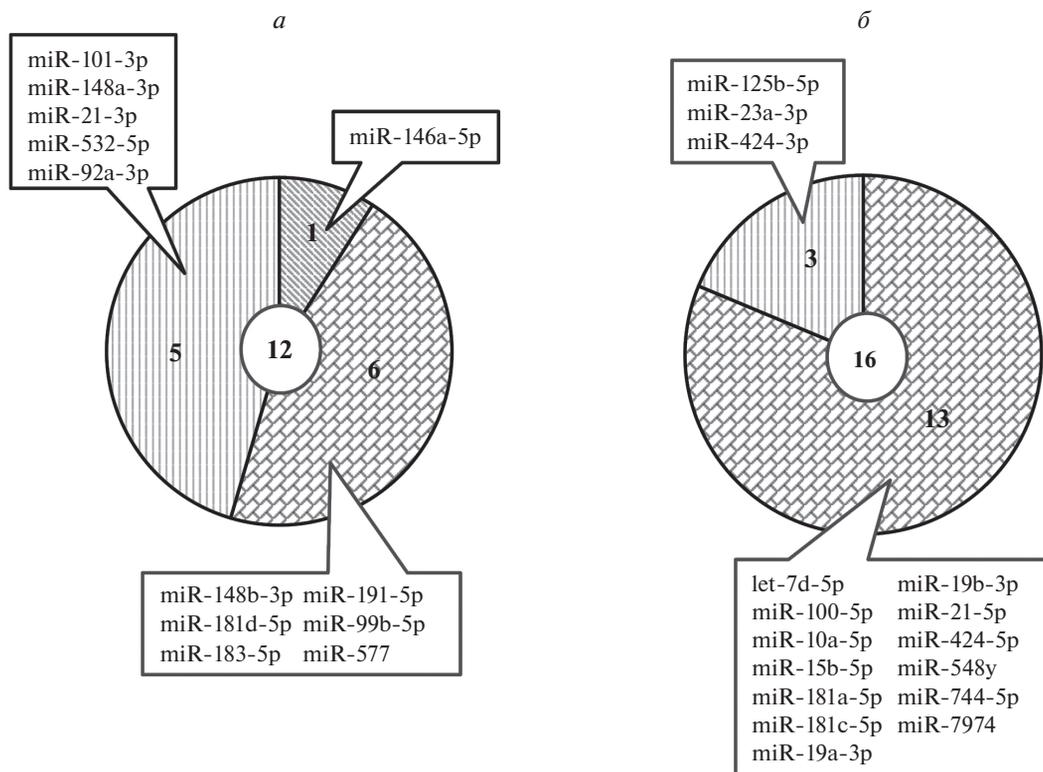
**Рис. 1.** Индуцированное радиацией изменение экспрессии микроРНК в клетках радиорезистентного варианта линии HeLa. *а* – увеличение экспрессии; *б* – снижение экспрессии; ▨ – микроРНК, показавшие однонаправленные значимые изменения экспрессии в клетках сравниваемых вариантов; ▩ – микроРНК, показавшие однонаправленные значимые изменения экспрессии в клетках исходного варианта либо на первые сутки, либо на восьмые сутки после радиационного воздействия; □ – микроРНК, показавшие отсутствие либо значимые противоположно направленные изменения экспрессии в исходном варианте клеточных линий.

анализ экспрессии микроРНК в клетках исходного и радиорезистентного варианта каждой линии были включены микроРНК, количество ридов которых хотя бы в одном из сравниваемых вариантов библиотек было больше или равно 25 (Приложение, табл. 1, 2).

*Спектр aberrантно экспрессирующихся микроРНК в клетках HeLa-RR и DU145-RR после гамма-облучения*

Дифференциальную экспрессию микроРНК измеряли в культивируемых клетках исходных и полученных радиорезистентных вариантов HeLa и DU145 на первые и восьмые сутки после однократного гамма-облучения в дозе 4 Гр. Были отобраны микроРНК, показавшие статистически значимые однонаправленные изменения экспрессии на первые и восьмые сутки после радиационного воздействия в клетках радиорезистентного варианта используемых в работе линий (Приложение, табл. 3, 4). В результате было отобрано 34 и 28 микроРНК соответственно в клетках HeLa-RR и DU145-RR (рис. 1, 2).

Сравнение экспрессии этих микроРНК с таковой в исходных вариантах линий позволило выделить три группы. Это, во-первых, группа микроРНК, показавших индуцированные радиацией однонаправленные изменения экспрессии в клетках сравниваемых вариантов. МикроРНК, относящиеся к этой группе, участвуют в ответе клеток на радиационное воздействие как в клетках исходного, так и радиорезистентного вариантов линий, однако не связаны с изменением радиорезистентности. Ко второй группе отнесены микроРНК, направление изменения экспрессии которых в клетках исходных и радиорезистентных вариантов совпадает лишь на один срок фиксации – на первые либо на восьмые сутки после радиационного воздействия. В данном случае связь микроРНК с изменением радиорезистентности, на наш взгляд, недостаточно доказана. И, наконец, к третьей группе отнесены микроРНК, показавшие отсутствие либо противоположное направление индуцированной радиацией aberrантной экспрессии в клетках исходного варианта по сравнению с таковой в радиорезистентном варианте этих линий. Изменение экспрессии этих микроРНК отражает сохраняющиеся в кле-



**Рис. 2.** Индуцированное радиацией изменение экспрессии микроРНК в клетках радиорезистентного варианта линии DU145. *а* – увеличение экспрессии; *б* – снижение экспрессии. ▨ – микроРНК, показавшие однонаправленные значимые изменения экспрессии в клетках сравниваемых вариантов; ▩ – микроРНК, показавшие однонаправленные значимые изменения экспрессии в клетках исходного варианта либо на первые сутки, либо на восьмые сутки после радиационного воздействия. □ – микроРНК, показавшие отсутствие либо значимые противоположно направленные изменения экспрессии в исходном варианте клеточных линий.

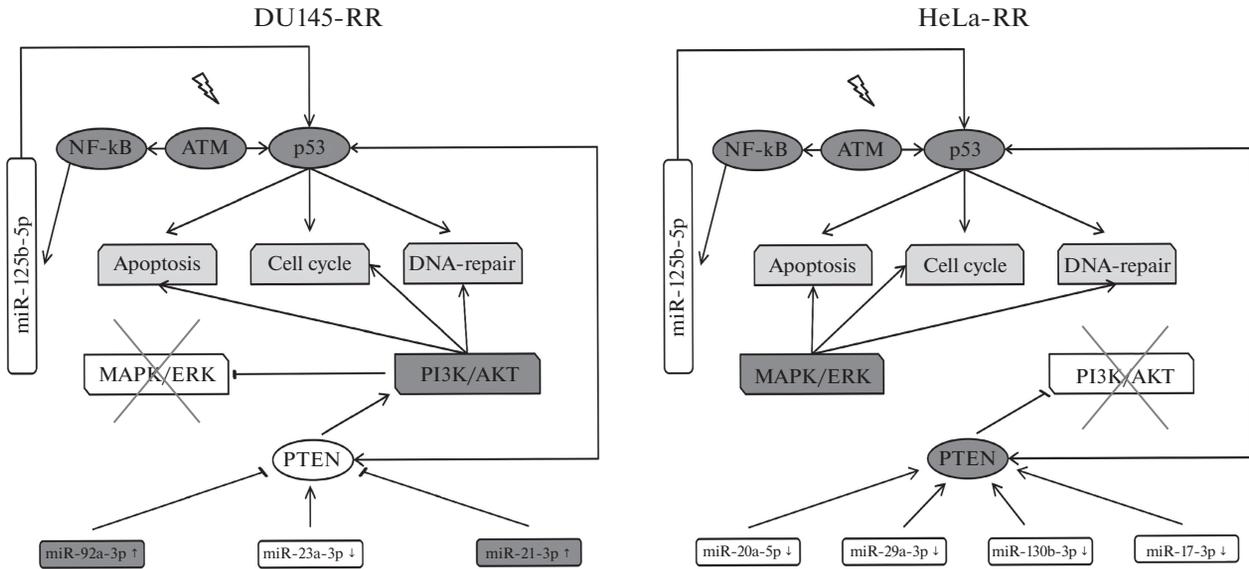
точных поколениях изменения метаболизма в клетках радиорезистентных вариантов по сравнению с исходными. Именно эти микроРНК являются предметом нашего дальнейшего анализа.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что существенную роль в контроле радиорезистентности играют сигнальные пути PI3K/AKT и MAPK/ERK (Ras/Raf/Mek/Erk) [14]. При этом PTEN выступает в качестве переключателя между этими сигнальными путями [15]. Для трех из восьми в случае клеток DU145 и четырех из восемнадцати для HeLa этот ген является мишенью отобранных нами микроРНК. *PTEN* является геном-супрессором опухоли, продукт которого обладает специфической фосфатазной активностью как в отношении белков, так и липидов [16]. Отщепляя фосфатную группу в положении 3D инозитольного кольца фосфатидилинозитол-3-фосфатов, *PTEN* блокирует передачу сигнала в PI3K/AKT-пути [17]. В ряде работ изучалось влияние *PTEN* на радиочувствительность. Полученные в этих исследованиях результаты оказались противоречивыми. В одних случа-

ях было показано, что ослабление функции *PTEN* приводит к увеличению радиорезистентности [18, 19], тогда как в других – увеличению чувствительности к действию ионизирующего излучения [20, 21]. В настоящее время установлено, что наряду с регуляцией PI3K/AKT-сигнального пути *PTEN* участвует в регуляции контрольных точек клеточного цикла в фазах G1 [22], S [23], G2 [24], M [25], репарации двунитевых разрывов ДНК [26], мутационных аддуктов [27] и поперечных сшивок ДНК [28], а также клеточного ответа на повреждение ДНК. Ключевую роль в ответе клеток на индукцию повреждений ДНК играет транскрипционный фактор p53. Показано, что *PTEN* активирует экспрессию p53, защищая от MDM2-опосредованной дегградации [29] и модифицируя его ДНК-связывающий сайт [30].

Для miR-125b-5p, которая снижает свою экспрессию в клетках как HeLa-RR, так и DU145-RR, мишенью является ген p53 [31]. В результате это может приводить к микроРНК-зависимой посттранскрипционной активации экспрессии p53 в клетках радиорезистентных вариантов обеих линий. Однако влияние *PTEN* на регуляцию транскрипционной активности p53 может различаться



**Рис. 3.** МикроРНК-зависимая регуляция функции PTEN в радиорезистентном варианте клеток HeLa и DU145. “↘” – усиление экспрессии гена или активация сигнального пути; “⊥” – подавление экспрессии гена или ингибирование сигнального пути.

у HeLa-RR и DU145-RR (рис. 3). Это связано со снижением экспрессии в клетках HeLa-RR четырех микроРНК – miR-130b-3p [32], miR-17-3p [33], miR-20a-5p [34] и miR-29a-3p [35], мишенями которых является ген *PTEN*, что приводит к его активации и, соответственно, к подавлению PI3K/AKT-сигнального пути. В клетках DU145-RR miR-21-3p [36] и miR-92a-3p [37], геном-мишенью которых является *PTEN*, увеличивают свою экспрессию и, как следствие, блокируют его активность. В результате происходит активация PI3K/AKT-сигнального пути и подавление MAPK/ERK-каскада за счет ингибирующего фосфорилирования Raf-1.

В настоящее время известно, что оба этих пути могут участвовать в контроле радиационной чувствительности клеток. Так, в работе Chang и соавт. [38] показано, что ингибирование PI3K/AKT-пути снижает резистентность клеток перевиваемых линий рака простаты к действию ионизирующего излучения. С другой стороны, на модели клеток перевиваемых линий эмбриональной рабдомиосаркомы продемонстрировано, что изменение активности MAPK/ERK-пути также может влиять на радиочувствительность клеток [39]. Это связано с тем, что оба пути участвуют в регуляции основных процессов, ответственных за чувствительность клеток к воздействию радиации – апоптоза, прохождения клеточного цикла и репарации ДНК. Из представленных в табл. 3 и 4 данных видно, что мишенями микроРНК, отобранных в клетках обоих радиорезистентных вариантов, являются гены, прямо или косвенно включенные в контроль этих процессов. Так, в клетках HeLa-RR четыре микроРНК участвуют в контроле апопто-

за, 11 – в контроле клеточного цикла и одна – в репарации ДНК. Для клеток DU145-RR показано участие четырех и трех микроРНК соответственно в контроле апоптоза и клеточного цикла. МикроРНК, связанных с процессами репарации ДНК в клетках DU145-RR, не идентифицировано. Эти данные указывают на то, что участие микроРНК в формировании радиорезистентности в данном случае может быть связано в основном с модуляцией процессов апоптоза и прохождения клеточного цикла, но не репарации ДНК.

В основе дифференциальной чувствительности клеток к действию ионизирующего излучения могут лежать либо традиционные мутации, либо эпигенетические изменения генома, модулирующие функцию генов, прямо или косвенно влияющих на их радиорезистентность. В настоящее время показано, что ионизирующее излучение вызывает сайт-специфическое гипер- и гипометилирование [42], играющее ключевую роль в индуцированной радиацией aberrантной экспрессии микроРНК, сохраняющейся в ряду клеточных поколений [10]. В клетках HeLa-RR экспрессия miR-20a-5p и miR-29a-3p, мишенями которых являются ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3A и DNMT3B [43, 44], уменьшается. Тогда как в клетках DU145-RR увеличена экспрессия miR-101-3p [45], miR-148a-3p [46, 47] и miR-92a-3p [43], репрессирующих функцию этих метилтрансфераз.

Экспрессия микроРНК зависит от транскрипционной активности их генов и посттранскрипционного дифференциального созревания. На сегодняшний день хорошо известно, что наряду с

**Таблица 3.** Гены-мишени микроРНК, участвующих в контроле радиорезистентности клеток DU145-RR

МикроРНК	Изменение экспрессии микроРНК	Гены-мишени		
		апоптоз	репарация ДНК	клеточный цикл
miR-101-3p	↑	<i>MCL1</i>		<i>CCND1</i>
miR-148a-3p	↑	<i>BCL2, BCL2L11, BAX</i>		<i>CDKN1B, CDC25B</i>
miR-92a-3p	↑	<i>BCL2L11</i>		
miR-125b-5p	↓	<i>MCL1, BCL2, BAK1, BCL2L2, BBC3</i>		<i>CDKN2A, CDKN2D</i>

Примечание. Источником информации о генах-мишенях отобранных нами микроРНК служили результаты, представленные в базе данных miRTarget 7.0 [40]. При этом учитывали только результаты, полученные с использованием “строгих” методов, подтверждающих взаимодействие микроРНК-мишень. При анализе участия генов-мишеней микроРНК в сигнальных путях использовали базу данных KEGG pathway [41].

**Таблица 4.** Гены-мишени микроРНК, участвующих в контроле радиорезистентности клеток HeLa-RR

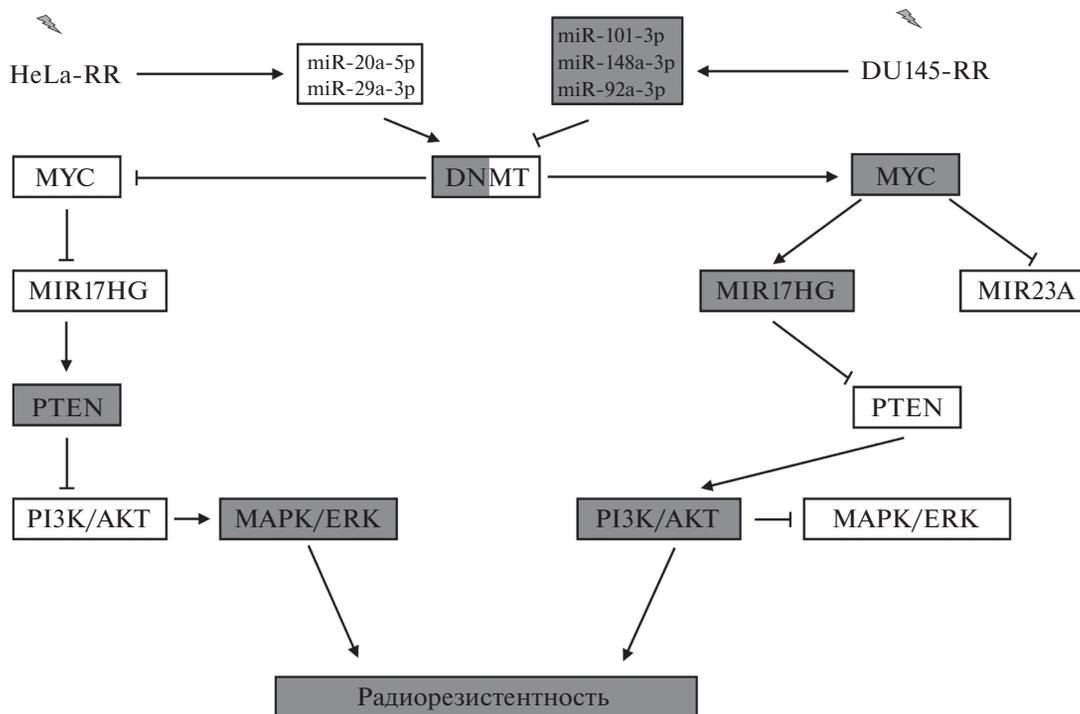
микроРНК	Изменение экспрессии микроРНК	Гены-мишени		
		апоптоз	репарация ДНК	клеточный цикл
miR-30a-3p	↑			<i>CDK6</i>
miR-340-5p	↑			<i>CDK6, CCND1, CCND2</i>
miR-130b-3p	↓			<i>CCNA2</i>
miR-125a-5p	↓	<i>MCL1, BCL2, BAK1, BCL2L12</i>		<i>CDKN1A</i>
miR-125b-5p	↓	<i>MCL1, BCL2, BAK1, BCL2L2, BBC3</i>		<i>CDKN2A, CDKN2D</i>
miR-128-3p	↓	<i>BAX</i>		<i>WEE1</i>
miR-193b-3p	↓	<i>MCL1</i>	<i>RAD51</i>	<i>CCND1</i>
miR-20a-5p	↓	<i>MCL1, BCL2, BCL2L11</i>		<i>CDKN1A, CCND1, CCND2, WEE1</i>
miR-27b-3p	↓			<i>CCNA2, WEE1</i>
miR-28-5p	↓			<i>CDKN1A</i>
miR-29a-3p	↓	<i>MCL1, BCL2</i>		<i>CDK2, CDK4, CDK6, CCND1, CCND2</i>

Примечание. Пояснения те же, что и в табл. 3.

p53 ключевую роль в регуляции экспрессии микроРНК играет транскрипционный регулятор Мус. Оба этих белка участвуют в контроле регуляции экспрессии микроРНК как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях [48, 49]. Под транскрипционным контролем гена *MYC* находится целый ряд генов микроРНК, в частности *MIR17HG* [50]. Он кодирует кластер микроРНК-17-92, включающий в себя шесть микроРНК [51], в том числе miR-17, miR-20a и miR-92a. К числу Мус-зависимых микроРНК относится также miR-23a [52]. Однако если при действии этого транскрипционного фактора кластер miR-17-92 активируется, то miR-23a супрессируется. Сравнение экспрессии отобранных нами Мус-зависимых микроРНК в клетках радиорезистентных вариантов показывает, что в отличие от клеток DU145-RR активность этого транскрипционного регулятора подавлена в клетках HeLa-RR. Данные различия могут быть связаны с дифференциальным метилированием промотора гена

*MYC*. Показано, что промотор гена *MYC* обогащен ЦГ-островками [53], а его транскрипционная активность зависит от уровня метилирования ДНК и, в частности, от функции ДНК-метилтрансфераз [54]. МикроРНК-зависимая активация ДНК-метилтрансфераз в клетках HeLa-RR может приводить к подавлению транскрипционной активности *MYC* и, как следствие, к изменению экспрессии микроРНК, находящихся под его контролем, в частности, снижению экспрессии miR-17-3p и miR-20a-5p. С другой стороны, в клетках DU145-RR увеличение экспрессии miR-101-3p и miR-148a-3p может приводить к подавлению активности ДНК-метилтрансфераз и, соответственно, к активации транскрипции гена *MYC*, что в свою очередь увеличивает экспрессию miR-92a-3p, участвующей в регуляции PTEN (рис. 4).

Полученные результаты дают основания полагать, что роль микроРНК связана с обеспечением функционального взаимодействия между ДНК-метилтрансферазами, транскрипционным регу-



**Рис. 4.** Участие микроРНК в регуляции активности сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK/ERK при формировании радиорезистентности в клетках HeLa и DU145. “\” — усиление экспрессии гена или активация сигнального пути; “⊥” — подавление экспрессии гена или ингибирование сигнального пути.

лятором Мус, а также фосфатазой PTEN в регуляции активности сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK/ERK. Это взаимодействие может лежать в основе различий в реализации радиорезистентности в клетках HeLa и DU145.

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

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shaltiel I.A., Krenning L., Bruinsma W., Medema R.H. The same, only different — DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 4. P. 607–620. <https://doi.org/10.1242/jcs.163766>
2. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // *Environ. Mol. Mutagen.* 2017. V. 58. № 5. P. 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
3. Korpela E., Vesprini D., Liu S.K. MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador? // *Br. J. Cancer.* 2015. V. 112. № 5. P. 777–782. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.6>
4. Yang Y.G., Qi Y. RNA-directed repair of DNA double-strand breaks // *DNA Repair (Amst).* 2015. V. 32. P. 82–85. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.017>
5. Metheetrirut C., Adams B.D., Nallur S. et al. cel-mir-237 and its homologue, hsa-miR-125b, modulate the cellular response to ionizing radiation // *Oncogene.* 2017. V. 36. № 4. P. 512–524. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.222>
6. Xu Z., Zhang Y., Ding J. et al. miR-17-3p downregulates mitochondrial antioxidant enzymes and enhances the radiosensitivity of prostate cancer cells // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2018. V. 13. P. 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.08.009>
7. Huang D., Bian G., Pan Y. et al. MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells // *Cancer Cell Int.* 2017. V. 17. P. 32. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0389-7>
8. Wang J., Xu J., Fu J. et al. MiR-29a regulates radiosensitivity in human intestinal cells by targeting PTEN gene // *Radiat. Res.* 2016. V. 186. № 3. P. 292–301. <https://doi.org/10.1667/RR14428.1>
9. Sun Q., Liu T., Zhang T. et al. MiR-101 sensitizes human nasopharyngeal carcinoma cells to radiation by targeting stathmin 1 // *Mol. Med. Rep.* 2015. V. 11. № 5. P. 3330–3336. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3221>
10. Чеботарев Д.А., Махоткин М.А., Набока А.В. и др. Получение радиорезистентных вариантов клеток линий HeLa и DU145 // *Наука Юга России.* 2017. Т. 13. № 4. С. 101–106. <https://doi.org/10.23885/2500-0640-2017-3-4-101-106>

11. *Tarasov V.A., Matushiov D.G., Shun E.F. et al.* Аберрантная экспрессия микроРНК при развитии злокачественных опухолей толстой кишки // Генетика. 2014. Т. 50. № 10. С. 1232–1244. <https://doi.org/10.7868/S0016675814080104>
12. *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. P. R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
13. *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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
14. *Zhao L., Lu X., Cao Y.* MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response // *Cell Signal.* 2013. V. 25. № 7. P. 1625–1634. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.004>
15. *Zhou J., Du T., Li B. et al.* Crosstalk between MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways during brain ischemia/reperfusion // *ASN Neuro.* 2015. V. 7. № 5. P. 1759091415602463. <https://doi.org/10.1177/1759091415602463>
16. *Kim D.H., Suh J., Surh Y.J., Na H.K.* Regulation of the tumor suppressor PTEN by natural anticancer compounds // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2017. V. 1401. № 1. P. 136–149. <https://doi.org/10.1111/nyas.13422>
17. *Araki K., Miyoshi Y.* Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer // *Breast Cancer.* 2018. V. 25. № 4. P. 392–401. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0812-x>
18. *Wu W., Chen X., Yu S. et al.* microRNA-222 promotes tumor growth and confers radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by targeting PTEN // *Mol. Med. Rep.* 2018. V. 17. № 1. P. 1305–1310. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7931>
19. *Zhang G., Wang W., Yao C. et al.* Radiation-resistant cancer stem-like cell properties are regulated by PTEN through the activity of nuclear  $\beta$ -catenin in nasopharyngeal carcinoma // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 43. P. 74661–74672. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20339>
20. *Gupta A., Yang Q., Pandita R.K. et al.* Cell cycle checkpoint defects contribute to genomic instability in PTEN deficient cells independent of DNA DSB repair // *Cell Cycle.* 2009. V. 8. № 14. P. 2198–2210. <https://doi.org/10.4161/cc.8.14.8947>
21. *Bassi C., Ho J., Srikumar T. et al.* Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress // *Science.* 2013. V. 341. № 6144. P. 395–399. <https://doi.org/10.1126/science.1236188>
22. *Ramaswamy S., Nakamura N., Vazquez F. et al.* Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 2110–2115. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2110>
23. *He J., Kang X., Yin Y. et al.* PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7620. <https://doi.org/10.1038/ncomms8620>
24. *Puc J., Keniry M., Li H.S. et al.* Lack of PTEN sequestrers CHK1 and initiates genetic instability // *Cancer Cell.* 2005. V. 7. № 2. P. 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.009>
25. *Shinde S.R., Gangula N.R., Kavela S. et al.* TOPK and PTEN participate in CHFR mediated mitotic checkpoint // *Cell Signal.* 2013. V. 25. № 12. P. 2511–2517. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.013>
26. *Sulkowski P.L., Scanlon S.E., Oeck S., Glazer P.M.* PTEN regulates nonhomologous end joining by epigenetic induction of NHEJ1/XLF // *Mol. Cancer Res.* 2018. V. 16. № 8. P. 1241–1254. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0581>
27. *Ming M., Feng L., Shea C.R. et al.* PTEN positively regulates UVB-induced DNA damage repair // *Cancer Res.* 2011. V. 71. № 15. P. 5287–5295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4614>
28. *Vuono E.A., Mukherjee A., Vierra D.A. et al.* The PTEN phosphatase functions cooperatively with the Fanconi anemia proteins in DNA crosslink repair // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 36439. <https://doi.org/10.1038/srep36439>
29. *Nakanishi A., Kitagishi Y., Ogura Y., Matsuda S.* The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer // *Int. J. Oncol.* 2014. V. 44. № 6. P. 1813–1819. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2377>
30. *Freeman D.J., Li A.G., Wei G. et al.* PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms // *Cancer Cell.* 2003. V. 3. № 2. P. 117–130. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00021-7)
31. *Nagpal V., Rai R., Place A.T. et al.* miR-125b is critical for fibroblast-to-myofibroblast transition and cardiac fibrosis // *Circulation.* 2016. V. 133. № 3. P. 291–301. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018174>
32. *Yuan B., Zou M., Zhao Y. et al.* Up-regulation of miR-130b-3p activates the PTEN/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway to defense against *Mycoplasma gallisepticum* (HS Strain) infection of chicken // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 8. P. E2172. <https://doi.org/10.3390/ijms19082172>
33. *Shan S.W., Fang L., Shatseva T. et al.* Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways // *J. Cell Sci.* 2013. V. 126. Pt. 6. P. 1517–1530. <https://doi.org/10.1242/jcs.122895>
34. *Jiang Y., Chang H., Chen G.* Effects of microRNA-20a on the proliferation, migration and apoptosis of multiple myeloma via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway // *Oncol. Lett.* 2018. V. 15. № 6. P. 10001–10007. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8555>
35. *Shi Z., Zhou H., Lu L. et al.* MicroRNA-29a regulates neural stem cell neuronal differentiation by targeting PTEN // *J. Cell Biochem.* 2018. V. 119. № 7. P. 5813–5820. <https://doi.org/10.1002/jcb.26768>
36. *Xu J., Zhang W., Lv Q., Zhu D.* Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN // *Oncol. Rep.* 2015. V. 33. № 6. P. 3108–3116. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3931>

37. Riley K.J., Rabinowitz G.S., Yario T.A. et al. EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 9. P. 2207–2221. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.63>
38. Chang L., Graham P.H., Hao J. et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways // *Cell Death Dis.* 2014. V. 5. P. e1437. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.415>
39. Ciccarelli C., Vulcano F., Milazzo L. et al. Key role of MEK/ERK pathway in sustaining tumorigenicity and in vitro radioresistance of embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population // *Mol. Cancer.* 2016. V. 15. P. 16. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0501-y>
40. Chou C.H., Shrestha S., Yang C.D. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D296–D302. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1067>
41. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M. et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
42. Antwi D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D. et al. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways // *Epigenetics.* 2013. V. 8. № 8. P. 839–848. <https://doi.org/10.4161/epi.25498>
43. Dakhallall D., Batte K., Wang Y. et al. Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2013. V. 187. № 4. P. 397–405. <https://doi.org/10.1164/rccm.201205-0888OC>
44. Oliveira L.H., Schiavinato J.L., Fráguas M.S. et al. Potential roles of microRNA-29a in the molecular pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Sci.* 2015. V. 106. № 10. P. 1264–1277. <https://doi.org/10.1111/cas.12766>
45. Wei X., Xiang T., Ren G. et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A // *Cell Signal.* 2013. V. 25. № 2. P. 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.10.013>
46. Jili S., Eryong L., Lijuan L., Chao Z. RUNX3 inhibits laryngeal squamous cell carcinoma malignancy under the regulation of miR-148a-3p/DNMT1 axis // *Cell Biochem. Funct.* 2016. V. 34. № 8. P. 597–605. <https://doi.org/10.1002/cbf.3233>
47. 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. <https://doi.org/10.1261/rna.972008>
48. Bui T.V., Mendell J.T. Myc: Maestro of MicroRNAs // *Genes. Cancer.* 2010. V. 1. № 6. P. 568–575. <https://doi.org/10.1177/1947601910377491>
49. Jones M., Lal A. MicroRNAs, wild-type and mutant p53: more questions than answers // *RNA Biol.* 2012. V. 9. № 6. P. 781–791. <https://doi.org/10.4161/rna.20146>
50. Morelli E., Biamonte L., Federico C. et al. Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PTi, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92 // *Blood.* 2018. V. 132. № 10. P. 1050–1063. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836601>
51. Fuziwara C.S., Kimura E.T. Insights into regulation of the miR-17-92 cluster of miRNAs in cancer // *Front. Med. (Lausanne).* 2015. V. 2. P. 64. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00064>
52. Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.C. et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism // *Nature.* 2009. V. 458. № 7239. P. 762–765. <https://doi.org/10.1038/nature07823>
53. Mao D.Y., Watson J.D., Yan P.S. et al. Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. № 10. P. 882–886. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00297-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00297-5)
54. Zakaria M.K., Khan I., Mani P. et al. Combination of hepatocyte specific delivery and transformation dependent expression of shRNA inducing transcriptional gene silencing of c-Myc promoter in hepatocellular carcinoma cells // *BMC Cancer.* 2014. V. 14. P. 582. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-582>

## The Influence of microRNAs in Regulation of Radioresistance of HeLa and DU145 Cells

D. A. Chebotarev<sup>a,\*</sup>, M. A. Makhotkin<sup>a</sup>, A. V. Naboka<sup>a</sup>, M. G. Tyutyakina<sup>a</sup>,  
E. N. Cherkasova<sup>a</sup>, and V. A. Tarasov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

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

Using the method of massively parallel sequencing, the spectrum of differential expression of miRNA was obtained after radiation exposure at a dose of 4 Gy in the initial and radioresistant variants of HeLa and DU145 cell lines. A comparative analysis allowed to identify a group of miRNAs, the aberrant expression of which represent the changes in cell metabolism of radioresistant variants that remain in a number of cell generations as compared to the initial ones. The obtained results suggest that the role of miRNA is associated with the maintenance of functional relationship between DNA methyltransferases, the transcriptional regulator Myc, and PTEN phosphatase in regulating the activity of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways. This may underlie of differences in the implementation of radioresistance in HeLa and DU145 cells.

**Keywords:** microRNA, massively parallel sequencing, radioresistance, apoptosis, cell cycle, cancer, DU145, HeLa.