

УДК 577.21

Р.Е. Ниязова, О.А. Берилло, Д.В. Задубенко, А.Т. Иващенко\*

Национальная нанотехнологическая лаборатория  
КазНУ им. аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы  
\*E-mail: a\_ivashchenko@mail.ru

### Взаимодействие miRNA с mRNA генов апоптоза при раке легкого

Изучено связывание miRNA с mRNA генов, участвующих в апоптозе. Установлено, что несколько miRNA имеют сайты связывания с mRNA одного гена, и одна miRNA может связываться с mRNA нескольких генов. Такими miRNA являются miR-619-5p, miR-1273g-3p, miR-1273h-3p, miR-5096, miR-5095, miR-5585-5p, названные ранее уникальными. Экспрессия большинства ключевых генов апоптоза может регулироваться с помощью miRNA. На основе связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в апоптозе, рекомендуется в качестве маркеров онкогенеза использовать miRNA, действующие на экспрессию нескольких генов. Экспрессия некоторых miRNA при разных субтипах рака легкого коррелирует с экспрессией их генов-мишеней. Обсуждаются характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов апоптоза при раке легкого.

**Ключевые слова:** miRNA, mRNA, сайты связывания, гены-мишени, апоптоз.

R.Y. Niyazova, O.A. Berillo, D.V. Zadubenko, A.T. Ivashchenko

### The interaction of miRNA with mRNA of apoptosis genes in lung cancer

Binding of miRNAs with mRNAs of genes involved in apoptosis were studied. It has been established that several miRNAs have binding sites with mRNA of a single gene and one miRNA can binds with mRNAs of several genes. These miRNAs are miR-619-5p, miR-1273g-3p, miR-1273h-3p, miR-5096, miR-5095 and miR-5585-5p. Expression of the most of key genes of apoptosis may regulated by using miRNAs. On the basis of miRNAs with mRNAs of genes involved in apoptosis is recommended to use miRNAs acting on the expression of several genes as markers of carcinogenesis. The expression of some miRNAs in different subtypes of lung cancer is correlated with the expression of their target genes. The characteristics of the interaction of miRNAs with mRNAs of genes of apoptosis in lung cancer are discussed.

**Key words:** miRNA, mRNA, binding sites, target genes, apoptosis.

Р.Е. Ниязова, О.А. Берилло, Д.В. Задубенко, А.Т. Иващенко

### Өкпе обыры кезінде miRNA-дың апоптоз гендерінің mRNA-мен байланысуы

Апоптозға қатысатын гендердің mRNA-мен miRNAлар байланысуы зерттелген. Кейбір miRNA-лар бір геннің mRNA-мен, бір miRNA бірнеше гендердің mRNA-мен байланыса алатыны анықталған. Мұндай miRNAларға miR-619-5p, miR-1273g-3p, miR-1273h-3p, miR-5096, miR-5095 және miR-5585-5p жатады. Апоптоздың негізгі гендердің экспрессиясы miRNAлар арқылы реттеле алады. Апоптозға қатысатын гендердің mRNA мен miRNAдың байланысу негізінде бірнеше гендердің экспрессиясына әсер ететін miRNAды онкогенез маркерлары ретінде қолданылуы ұсынылады. Кейбір miRNAдың өкпе обырының түрлі субтиптері кезіндегі экспрессиясы олардың нысана гендерімен корреляцияланады. miRNAдың апоптоз гендерінің өкпе обыры кезіндегі байланысу сипаттамалары қарастырылады.

**Түйін сөздер:** miRNA, mRNA, байланысу сайттар, нысана гендер, апоптоз.

Для всех злокачественных опухолей в разных тканях характерна повышенная пролиферация клеток по сравнению с нормой [1]. Про-

лиферация клеток главным образом зависит от скорости апоптоза и клеточного цикла. Известно, что экспрессия некоторых генов, участвую-

щих в апоптозе, зависит от miRNA [2-4]. В связи с этим представляется важным установить, на какие гены апоптоза и в какой степени могут влиять miRNA. Знание генов мишеней для miRNA будет способствовать разработке методов диагностики и позволит более целенаправленно применять виды терапии.

### Материалы и методы

Все нуклеотидные последовательности mRNA генов заимствовали из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности miRNA получены из базы miRBase (<http://www.mirbase.org>). Программа RNAHybrid использовалась для поиска сайтов связывания, свободной энергии связывания (DG) и схемы их взаимодействия. Величину DG/DG<sub>m</sub> использовали в качестве сравнительного количественного критерия силы взаимодействия miRNA с mRNA, где DG<sub>m</sub> равна энергии связи miRNA с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Программа E-RNAhybrid рассчитывает отношение DG/DG<sub>m</sub>, значение достоверности, определяет область расположения сайта microRNA в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), белок-кодирующей части (CDS) или 3'-нетранслируемом участке (3'UTR). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили по программе MirTarget [5]. Для поиска miRNA, онкогенов, онкосупрессоров и других сведений о процессах онкогенеза использованы разработанные в лаборатории программы: программы miRAFinder и GeneAFinder для поиска информации по microRNA и генам; программы TmiRUSite и TmiROSite для поиска нуклеотидных фрагментов mRNA с сайтами связывания и кодируемых ими аминокислотных последовательностей [6, 7].

### Результаты и их обсуждение

Нами установлены многие miRNA, связывающиеся с высокой эффективностью с mRNA генов, участвующих в апоптозе (рисунок 1 и таблица 1). Названия некоторых генов, приведенных в схеме KEGG, являются синонимичными официальным названиям, указанным в скобках: *Akt* (*AKT1*), *Apaf-1* (*APAF1*), *Bcl-2* (*BCL2*), *Bcl-2 XL* (*BCL2L1*), *Bid* (*BID*), *FLIP* (*CFLAR*), *DDF45* (*DDFA*), *DDF40* (*DDFB*), *Fas-L* (*FASLG*), *IKK* (*IKBIP*), *IRAK* (*IRAK1*), *NIK* (*MAP3K14*), *NF-κB1* (*NFKB1*), *TNF-R1* (*TNFRSF1A*), *p53* (*TP53*).

Наибольшее число сайтов связывания miRNA имеет mRNA гена *CASP10*. Из десяти miRNA четыре (miR-1273g-3p, miR-619-5p, miR-1273h-3p, miR-5585-5p) являются уникальными, то есть влияют на экспрессию более чем 300 генов [8-9]. При этом miR-1273h-3p имеет два сайта связывания в mRNA гена *CASP10*, один из них полностью комплементарен этой miRNA. Следовательно, экспрессия гена *CASP10* находится под сильным контролем miR-1273h-3p и других miRNA.

Девять miRNA связываются с mRNA гена *DDFA*. Среди них четыре уникальные: miR-5096, miR-619-5p, miR-1273g-3p, miR-5095. Экспрессия генов *FLIP* и *APAF1* тоже находится под сильным контролем miRNA. С miRNA этих генов связываются восемь и семь miRNA, соответственно. mRNA гена *NFKB1* является мишенью шести miRNA. Экспрессия каждого из генов *IKK*, *P53* и *DDF40* находится под контролем пяти miRNA.

В целом экспрессия ключевых генов апоптоза находится под контролем многих miRNA, что свидетельствует об их важной роли в регуляции апоптоза. Ингибирование трансляции mRNA этих генов прямо отражается в понижении скорости апоптоза, а снижение концентрации miRNA будет способствовать усилению апоптоза. То есть отклонение концентрации miRNA от нормы будет разнонаправлено отражаться на онкогенезе.

mRNA гена-мишени *TP53* является общей для апоптоза и клеточного цикла. Помимо miRNA, ингибирующих трансляцию mRNA *TP53*, есть и другие общие 88 miRNA, характерные для регуляции экспрессии генов апоптоза и клеточного цикла: miR-1227-5p, miR-1260a, miR-1260b, miR-1268a, miR-1268b, miR-1273a, miR-1273c, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-3p, miR-1285-5p, miR-1303, miR-1322, miR-149-3p, miR-1825, miR-1908-3p, miR-1913, miR-1972, miR-3119, miR-3141, miR-3155b, miR-3156-3p, miR-3178, miR-3195, miR-320c, miR-3620-5p, miR-3656, miR-3681-3p, miR-3685, miR-383-3p, miR-3940-3p, miR-3960, miR-4258, miR-4265, miR-4271, miR-4274, miR-4292, miR-4430, miR-4463, miR-4486, miR-4487, miR-4492, miR-4497, miR-4505, miR-4507, miR-4508, miR-4516, miR-4519, miR-4530, miR-4532, miR-4539, miR-4651, miR-466, miR-4685-3p, miR-4690-5p, miR-4736, miR-4749-3p, miR-4762-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-5585-5p, miR-566, miR-5684, miR-5708,

miR-574-5p, miR-6089, miR-6124, miR-6125, miR-6132, miR-619-5p, miR-6507-5p, miR-6511a-3p, miR-6511b-3p, miR-6742-5p, miR-6786-5p, miR-6803-3p, miR-6813-3p, miR-6816-5p, miR-6817-3p, miR-6824-5p, miR-6829-3p, miR-6842-5p, miR-6877-5p, miR-7851-3p, miR-877-3p. Среди них можно выделить несколько семейств близкородственных miRNA – miR-1260, miR-1268, miR-1273, miR-6511. В этот список также вошли вышеописанные нами уникальные miRNA – miR-5096, miR-619-5p, miR-1273g-3p, miR-5095 [8, 9]. Степень действия и регуляции этих miRNA на апоптоза и клеточного цикл от-

личается. Отличие состоит в том, что генов-мишеней клеточного цикла для некоторых miRNA из этого списка будет больше, чем для апоптоза и наоборот. Например, miR-1273f имеет сайты связывания только с mRNA *DFFB* гена-мишени апоптоза и пять генов-мишеней клеточного цикла (*E2F2*, *MDM2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *TFDP2*), таким образом, при сверхэкспрессии этой miRNA есть большая вероятность подавления клеточного цикла, чем апоптоза. Наличие наибольшего количества мишеней среди генов клеточного цикла или апоптоза будет определять преимущественное действие их на эти процессы.

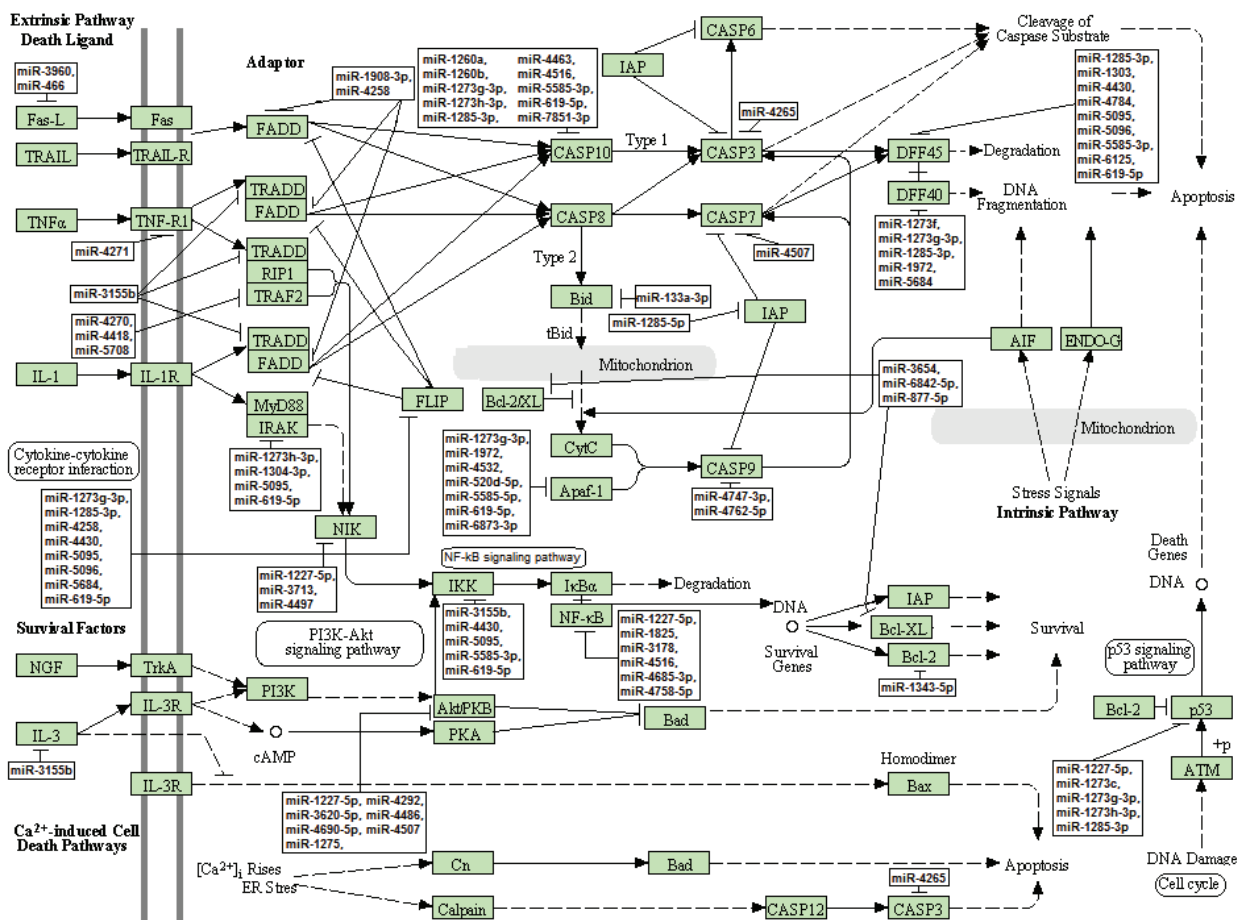


Рисунок 1 – Гены, участвующие в разных путях апоптоза, и miRNA, регулирующие их экспрессию

Таблица 1 – Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов апоптоза

Ген	Характеристики сайтов связывания miRNA
<i>AKT1</i>	miR-1227-5p, 154°, 92; miR-1275, 2020°, 93; miR-3620-5p, 164°, 94; miR-4292, 172°, 90; miR-4486, 159°, 91; miR-4507, 161°, 91; miR-4690-5p, 156°, 90.
<i>APAF1</i>	miR-1273g-3p, 4931°, 91; 5230°, 96; miR-1972, 5169°, 93; miR-4532, 124°, 94; miR-520d-5p, 1527°, 90; miR-5585-5p, 5012°, 91; miR-619-5p, 6736°, 95; miR-6873-3p, 552°, 91.
<i>BCL2</i>	miR-1343-5p, 606°, 90.
<i>BCL2L1</i>	miR-3654, 2107°, 90; miR-6842-5p, 1692°, 93; miR-877-5p, 148°, 92.
<i>BID</i>	miR-133a-3p, 810°, 91.
<i>CASP10</i>	miR-1260a, 2595°, 91; miR-1260b, 2594°, 92; miR-1273g-3p, 2588°, 93; miR-1273h-3p, 2233°, 91; 2622°, 100; miR-1285-3p, 2356°, 91; miR-4463, 5821°, 91; miR-4516, 5822°, 91; miR-5585-3p, 3388°, 93; miR-619-5p, 3246°, 93; miR-7851-3p, 2656°, 91.
<i>CASP3</i>	miR-4265, 2379°, 90.
<i>CASP7</i>	miR-4507, 167°, 91.
<i>CASP9</i>	miR-4747-3p, 1068°, 92; miR-4762-5p, 410°, 90.
<i>CFLAR</i>	miR-1273g-3p, 3666°, 96; miR-1285-3p, 5665°, 91; 6569°, 91; miR-4258, 4960°, 92; miR-4430, 5006°, 92; miR-5095, 6324°, 91; miR-5096, 2426°, 92; 5125°, 91; miR-5684, 3660°, 90; miR-619-5p, 2352°, 95; 6330°, 95.
<i>DFFA</i>	miR-1285-3p, 2038°, 91; 2984°, 96; miR-1303, 2048°, 91; 2994°, 91; miR-4430, 1720°, 92; 2968°, 92; miR-4784, 656°, 90; miR-5095, 1788°, 98; 2738°, 95; miR-5096, 1594°, 98; miR-5585-3p, 1939°, 98; 3264°, 95; miR-6125, 40°, 95; miR-619-5p, 1794°, 98; 2744°, 98; 3124°, 95; miR-1273f, 2242°, 92; miR-1273g-3p, 1565°, 93; 2209°, 96; miR-1285-3p, 2192°, 91; miR-1972, 1763°, 93; miR-5684, 2203°, 92.
<i>FADD</i>	miR-1908-3p, 543°, 90; miR-4258, 542°, 90.
<i>FASLG</i>	miR-3960, 323°, 90; miR-466, 1603°, 91; 1605°, 91; 1607°, 91; 1609°, 91; 1611°, 91; 1613°, 93.
<i>IKBIP</i>	miR-3155b, 154°, 92; miR-4430, 2307°, 92; miR-5095, 2077°, 91; miR-5585-3p, 2224°, 96; miR-619-5p, 2083°, 91.
<i>IRAK1</i>	miR-1273h-3p, 2895°, 93; miR-1304-3p, 2899°, 91; miR-5095, 2694°, 95; miR-619-5p, 2700°, 98.
<i>MAP3K14</i>	miR-1227-5p, 1042°, 92; miR-3713, 836°, 90; miR-4497, 3029°, 90.
<i>NFKB1</i>	miR-1227-5p, 227°, 94; miR-1825, 1647°, 92; miR-3178, 305°, 90; miR-4516, 161°, 91; miR-4685-3p, 42°, 93; miR-4758-5p, 305°, 94.
<i>TNFRSF1A</i>	miR-4271, 51°, 92.
<i>TP53</i>	miR-1227-5p, 648°, 92; miR-1273c, 2296°, 91; miR-1273g-3p, 2316°, 91; miR-1273h-3p, 2350°, 91; miR-1285-3p, 2300°, 95.
<i>TRADD</i>	miR-3155b, 918°, 90.
<i>TRAF2</i>	miR-4270, 75°, 91; miR-4418, 953°, 91; miR-5708, 1595°, 90.

Примечание: \* – miRNA, позиция сайта связывания в mRNA (н), значение  $\Delta G/\Delta G_m$  (%); ■ – обозначает CDS; ° – обозначает 3'UTR; ° – обозначает 5'UTR.

Среди установленных генов мишеней для miRNA имеются такие, для которых установлено, что их экспрессия изменяется вместе с изменением концентрации некоторых miRNA. Например, miR-663 высоко экспрессируется при раке легкого. Она участвует в пролиферации клеток путем прямой или косвенной регуляции генов *TGFB1*, *P53*, *BAX* и *FAS*. Полагают, что miR-663 играет важную роль в развитии рака легкого и может использоваться в терапии посредством действия на гены мишени [10]. Экспрессия miR-26a отчетливо снижается в клетках опухоли легкого по сравнению с нормальной

тканью. Сверхэкспрессия miR-26a в клеточной линии A549 рака легкого человека снижает пролиферацию клеток путем блокирования перехода между фазами G1/S, индуцирует апоптоз и ингибирует метастаз и инвазию *in vitro*. miR-26a играет роль антионкогена и может быть полезной в терапии рака легкого [11]. Пониженная экспрессия miR-101 ассоциируется с сверхэкспрессией *EZH2* при немелкоклеточном субтипе рака легкого (NSCLC). Трансфекция miR-101 снижала экспрессию *EZH2* и приводила к понижению пролиферации клеток при NSCLC посредством индукции апоптоза. Авторы предла-

гают использовать miR-101 для репрессии гена *EZH2* [12]. Показано, что экспрессия miR-451 сильно снижена в опухоли при NSCLC. Повышенная экспрессия miR-451 значительно угнетала *in vitro* пролиферацию и образование колоний клеток NSCLC и развитие метастазов у мыши посредством повышения апоптоза, возможно посредством инактивации Akt сигнального пути. Экспрессия miR-451 значительно ингибировала синтез белка RAB14. Авторы полагают, что взаимодействие miR-451/RAB14 можно использовать в терапии пациентов с NSCLC [13]. Экспрессия miR-100 тесно коррелирует со стадиями развития NSCLC. Выживаемость пациентов с низким уровнем miR-100 была значительно ниже, чем у пациентов с высоким уровнем miR-100. Показано, что miR-100 тормозит переход G2/M и повышает апоптоз в клетках NSCLC [14]. Появление miR-21 в плазме коррелирует с TNM-стадией и метастазом у пациентов с NSCLC. MiR-21 проявляет свое действие посредством модуляции PTEN сигнального пути [15]. Экспрессия miR-335 значительно снижена в ткани NSCLC. Показано, что эта miRNA связана с метастазирующей способностью, инвазией и апоптозом в клеточных линиях A549 и H1299 NSCLC. Её потенциальными мишенями являются *Bcl-w* и *SP1* [16]. miR-196a высоко экспрессируется как в образцах NSCLC, так и в клеточных

линиях по сравнению с нормой. Показана связь между экспрессией miR-196a и пролиферацией, миграцией и инвазией клеток NSCLC. miR-196a прямо и обратимо регулирует экспрессию гена *HOXA5*. Рекомендуют использовать miR-196a в качестве терапевтического средства при NSCLC [17].

В качестве маркеров онкогенеза на основе связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в апоптозе, можно использовать miRNA, действующие на экспрессию нескольких генов. Такими miRNA являются miR-619-5p, miR-1273g-3p, miR-5096, miR-5095, miR-5585-5p. Для большей достоверности предсказания участия этих miRNA в онкогенезе необходимо контролировать экспрессию их генов мишеней. Метод ранней диагностики рака легкого заключается в контроле уровня экспрессии предложенных miRNA в крови, поскольку mRNA их генов мишеней может не попадать в кровь. В случае биопсийного материала необходимо контролировать экспрессию как miRNA, так и их генов мишеней. Такое тестирование экспрессии miRNA и их генов мишеней существенно повысит вероятность правильного определения конкретных генов, участвующих в развитии рака у конкретного больного. Такой подход, кроме диагностики, создает основу для использования соответствующих терапевтических методов.

#### Литература

- 1 Wong R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* – 2011. – Vol. 30. – P. 87.
- 2 Zhang Q., Padi S.K., Tindall D.J., Guo B. Polycomb protein EZH2 suppresses apoptosis by silencing the proapoptotic miR-31 // *Cell Death & Disease*. – 2014. – Vol. 5. – e1486.
- 3 Otsuka K., Ochiya T. Genetic networks lead and follow tumor development: microRNA regulation of cell cycle and apoptosis in the p53 pathways // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 749724.
- 4 Wan L., Zhu L., Xu J., Lu B., Yang Y., Liu F., Wang Z. MicroRNA-409-3p Functions as a Tumor Suppressor in Human Lung Adenocarcinoma by Targeting c-Met // *Cell Physiology and Biochemistry*. – 2014. – Vol. 34(4). – P. 1273–1290.
- 5 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. and Atambayeva Sh. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformation*. – 2014. – Vol. 10(7). – P. 423–427.
- 6 Berillo O., Regnier M., Ivashchenko A.T. miRAFinder and GeneAFinder scripts: large-scale searching for microRNA and related information in indexed literature abstracts // *Bioinformation*. – 2014. – Vol. 10(8). – P. 539–543.
- 7 Berillo O., Regnier M., Ivashchenko A.T. TmiRUSite and TmiROSite scripts: searching for mRNA fragments with microRNA binding sites and their encoded for amino acid sequences // *Bioinformation*. – 2014. – Vol. 10(7). – P. 472–473.
- 8 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. and Atambayeva Sh. Binding sites of miR-1273 family on the mRNA of target genes // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 620530.
- 9 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. and Atambayeva Sh. The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 720715.
- 10 Liu Z.Y., Zhang G.L., Wang M.M., Xiong Y.N., Cui H.Q. MicroRNA-663 targets TGFBI and regulates lung cancer proliferation // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2011. – Vol. 12(11) – P. 2819–2823.
- 11 Dang X., Ma A., Yang L., Hu H., Zhu B., Shang D., Chen T., Luo Y. MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells // *Cancer Genetics*. – 2012. – Vol.205(3) – P. 13–23.

- 12 Zhang J.G., Guo J.F., Liu D.L., Liu Q., Wang J.J. MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2 // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2011. – Vol. 6(4). – P. 671–678.
- 13 Wang R., Wang Z.X., Yang J.S., Pan X., De W., Chen L.B. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14) // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30(23). – P. 2644–2658.
- 14 Liu J., Lu K.H., Liu Z.L., Sun M., De W., Wang Z.X. MicroRNA-100 is a potential molecular marker of non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo-like kinase 1 // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 519.
- 15 Liu Z.L., Wang H., Liu J., Wang Z.X. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2013. – Vol. 372(1–2). – P. 35–45.
- 16 Wang H., Li M., Zhang R., Wang Y., Zang W., Ma Y., Zhao G., Zhang G. Effect of miR-335 upregulation on the apoptosis and invasion of lung cancer cell A549 and H1299 // *Tumour Biology*. – 2013. – Vol. 34(5). – P. 3101–3109.
- 17 Liu X.H., Lu K.H., Wang K.M., Sun M., Zhang E.B., Yang J.S., Yin D.D., Liu Z.L., Zhou J., Liu Z.J., De W., Wang Z.X. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5 // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 348.