

УДК 577.29

¹О.А. Берилло*, ²М. Ренье¹Национальная нанотехнологическая лаборатория КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан²AMIB-Inria team, LIX-Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France

*e-mail: devolia18@mail.ru

Сайты связывания miRNA-маркеров рака молочной железы

1300 абстракт статей, посвященных поиску маркерных miRNA для диагностики рака молочной железы, обработаны с помощью скрипта miRCancer. Проведен поиск сайтов связывания 357 miRNA в mRNA 427 генов, белки которых участвуют в онкогенезе молочной железы. Используя программу MirTarget отобраны сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS, 3'UTR mRNA со свободной энергией гибридизации равной 90% и более. Нами выявлено, что miR-665 и miR-4417 являются перспективными маркерами для диагностики рака молочной железы.

Ключевые слова: miRNA, рак молочной железы, маркер, miR-665, miR-4417.

О.А. Берилло, М. Ренье

Сүт безі обырының miRNA-маркерларындағы байланысу сайттары

Сүт безінің обыры диагностикасын жүргізу үшін miRCancer скрипті қолданып 1300 мақалалардың абстракттары қарастырылған. 357 miRNA-дың 427 гендердің mRNA байланысу сайттарына іздестіру жүргізілген. Бұл гендердің ақуыздары сүт безінің онкогенезіне қатысады. MirTarget бағдарламасын қолданып mRNA 5'UTR, CDS, 3'UTR бос гибридизация энергиясы 90% жоғары сайттар анықталған. miR-665 және miR-4417 сүт безінің диагностикасын өткізу үшін перспективті маркерлер болатындығы анықталды.

Түйін сөздер: miRNA, сүт безінің обыры, маркер, miR-665, miR-4417.

O.A. Berillo, M. Régnier

The miRNA-marker binding sites of breast cancer

1300 abstracts of articles devoted to search for miRNA markers for diagnostics of breast cancer were processed by miRCancer script. Search for binding sites of 357 miRNAs in mRNAs of 427 genes which proteins participate in breast cancer. The miRNA binding sites in 5'UTR, CDS, 3'UTR of mRNAs with free hybridization energy equaled greater than 90% were selected using MirTarget program. It was revealed, that miR-4417 and miR-665 are more prospect markers for prediction of breast cancer.

Keywords: mRNA, miRNA, breast cancer, marker, miR-665, miR-4417.

Рак молочной железы является широко распространенной причиной смертности женщин во многих странах мира. Раннее выявление этого онкологического заболевания усложняется бессимптомным протеканием и недостатком эффективных диагностических биомаркеров [1]. Эта проблема не утрачивает актуальности в настоящее время. На протяжении последних 70 лет опубликовано более 136 000 статей (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), посвященных поиску методов ранней диагностики рака молочной железы. Гистологический анализ опухолевых тканей [2] является классическим методом ис-

следования и в настоящее время, но малоэффективным. Постоянно проводится поиск более специфических маркеров, необходимых для ранней неинвазивной диагностики, замещающих уже существующие инвазивные эндоскопические маркеры. 47 лет назад появились первые работы, посвященные поиску биомаркеров в сыворотке крови [3]. В большинстве случаев исследовали изменения концентрации белков на разных стадиях заболевания. Рак молочной железы является комплексным и гетерогенным заболеванием на молекулярном уровне, поэтому до сих пор не найдено маркера эффективной

однозначной ранней диагностики. Однако, в течении последних девяти лет ученые ведут интенсивный поиск маркеров среди нуклеиновых кислот, в частности, miRNA, чья экспрессия изменяется при онкогенезе [4]. miRNA являются короткими РНК последовательностями, которые подавляют трансляцию mRNA генов-мишеней [5]. Основная часть miRNA являются интронными (in-miRNA) и межгенными (ig-miRNA). Созревание in-miRNA происходит после сплайсинга их хозяйских генов. miRNA функционируют в составе RISC-комплекса и связываются с почти полной комплементарной последовательностью участка mRNA генов-мишеней [6]. В настоящее время известно более 2500 miRNA. Экспрессия miRNA связана с возникновением, метастазированием и прогрессированием злокачественных опухолей. Увеличение или снижение концентрации miRNA выявлено в разном количественном и качественном составе в биологических жидкостях больных раком молочной железы [7-9]. Многие гены, вовлеченные в онкогенез являются онкогенами или онкосупрессорами [10]. В настоящее время выявлена абберантная экспрессия нескольких десятков miRNA. Важно знать на какие mRNA генов-мишеней они действуют и какую биологическую роль выполняют. Выбор маркеров затруднен тем, что изменения в экспрессии многих miRNA выявляется при развитии онкологических заболеваний других органов [11-14]. В связи с чем, целью нашего исследования было найти высоко-комплементарные сайты связывания маркерных miRNA с mRNA генов, которые вовлечены в онкогенез только молочной железы.

Материалы и методы

Абстракты статей получены из базы данных PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Большинство статей посвящено экспериментальным исследованиям рака молочной железы человека и небольшое число – модельным животным. Скрипт miRCancer позволяет найти в тексте абстрактов: miRNA, идентификационный номер статьи (PMID), локализацию онкологического заболевания и список ключевых слов для общей характеристики статьи. Нуклеотидные последовательности mRNA генов человека получены из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) через использование скрипта Lextractor002 ([malahaenee/software\). miRNA взяты из miRBase \(<http://mirbase.org>\). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили с применением программы MirTarget. Программа определяет: начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов в 5'-нетранслируемом участке \(5'UTR\), в белок-кодирующей части \(CDS\) и в 3'UTR mRNA; свободную энергию гибридизации \(\$\Delta G\$, kJ/mole\) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Для каждого сайта рассчитывали отношение \$\Delta G/\Delta G_m\$ \(%\), где \$\Delta G_m\$ равно свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отбирали с отношением \$\Delta G/\Delta G_m\$ равным более 90%. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида 5'UTR mRNA. Программа MirTarget, скрипты miRCancer и Lextractor002 написаны в нашей лаборатории на программных языках Java, Python и Perl соответственно.](http://sites.google.com/site/</p></div><div data-bbox=)

Результаты и их обсуждение

Нами отобрано 1300 абстрактов статей из базы данных PubMed, которые посвящены поиску маркерных miRNA для диагностики рака молочной железы (с 2005 по 2013 года). С помощью скрипта miRCancer нами было выявлено 357 miRNA. Однако, истинный список miRNA намного меньше по причинам изменения классификации miRNA по мере их идентификации. Например, ранее была выявлена функционирование только miR-125, но после более углубленного изучения экспрессии коротких РНК было показано: что и ее комплементарная последовательность тоже является зрелой. Помимо этого, найдены другие гомологичные ей miRNA. Поэтому miR-125 была переименована в miR-125a-5p, ее комплементарная последовательность – в miR-125a-3p и гомологичные – в miR-125b и т. д. MiR-10* была переименована в miR-10-3p, как и другие miRNA, обозначаемые *. После исключения особенностей изменения классификации было выявлено 312 miRNA. Поиск сайтов связывания этих miRNA был проведен в mRNA 427 генов, вовлеченных в онкогенез молочной железы. Для этого использовали программу MirTarget и отбирали сайты связывания с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. Нами найдено 114 сайтов связывания, образуемые между 93 mRNA генов-мишеней и 43 miRNA. 18 miRNA имеют интрогенное происхождение,

23 – межгенное и происхождение двух miRNA (**miR-328-5p**, **miR-383-3p**) не установлено. Основная часть отобранных miRNA имеют один или несколько сайтов связывания. Например, in-miR-95-5p, кодируемая в гене ABLIM2 имеет сайт связывания с mRNA LYVE1; ig-miR-424-3p – ST18; in-miR-1290 (ALDH4A1) – MAGED1, NF1; in-miR-149-3p (GPC1) – MEF2C, NCOR2, PTPRK и т. д. Однако несколько miRNA имеют большое количество и сайтов связывания и генов-мишеней, вовлеченных в процесс развития рака молочной железы. Например, in-miR-574-5p, кодируемая в гене FAM114A1 имеет сайты связывания с 23 mRNA генов-мишеней; ig-miR-1303 может регулировать трансляцию 13 mRNA генов. 48 из 93 генов-мишеней являются онкосупрессорами и 18 – онкогенами.

Выявлено 17 генов, которые являются мишенями для изучаемых маркерных miRNA и хозяйскими генами других интронных miRNA. Например, BIRC6 кодирует in-miR-558 и является мишенью для межгенной miR-195-5p; ITGAL (miR-4518) – ig-miR-513a-5p; KIAA1199 (miR-549a) – ig-miR-219b-5p. Выявлены случаи, когда MGAT5 является хозяйским геном для miR-3679-3p, miR-3679-5p и мишенью для in-miR-107, кодируемой в гене PANK1; PPARGC1B (miR-378a-3p, miR-378a-5p) – miR-760 (BCAR3). В некоторых случаях, маркерная miRNA имеет сайты связывания в нескольких mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы. Например, ig-miR-1303 может ингибировать трансляцию хозяйских генов: AK1 (miR-4672), ITCH (miR-644), TNFRSF1B (miR-4632-3p, miR-4632-5p), LPP (miR-28-3p, miR-28-5p), где в скобках указаны кодируемые ими miRNA. Следовательно, трансляция mRNA хозяйских генов-мишеней может зависеть от экспрессии miR-1303, но при этом miR-4672, miR-644, miR-4632-3p, miR-4632-5p, miR-28-3p, miR-28-5p будут нормально функционировать. Такой регуляторный механизм позволяет вырабатывать значительное количество miRNA без трансляции mRNA хозяйского гена. Подобная ситуация наблюдается и с интронной miR-574-5p, которая кодируется хозяйским геном FAM114A1. Ее мишенями являются другие хозяйские гены: ANK1 (miR-486-3p, miR-486-5p), ARRB1 (miR-326), CHST11 (miR-3922-3p, miR-3922-5p), GRID1 (miR-346), IGF2 (miR-483-3p, miR-483-5p), LPP (miR-28-3p, -5p), NAV1 (miR-

1231, miR-5191), где в скобках указаны кодируемые ими miRNA. Таким образом, выявленные miRNA, действующие на mRNA хозяйских генов ингибируют только трансляцию белка, а экспрессия интронных miRNA будет продолжаться беспрепятственно.

Выбор, как и поиск маркеров осложняется и тем, что изменения экспрессии этих miRNA показано при разных видах онкологических заболеваний. Например, дифференциальная экспрессия miR-574-5p наблюдается при развитии рака молочной железы [9], легкого [11], пищевода [12], толстой кишки [13], щитовидной железы [14] и т.д. В настоящее время, две miRNA выявлены как возможные маркеры для диагностики только рака молочной железы: miR-665 и miR-4417. Изменения в их экспрессии пока не выявлены при других онкологических заболеваниях. Значительное снижение экспрессии miR-665 выявлены в 48 образцах ткани ($p < 0.01$) и 100 образцах крови (с пороговым циклом 35) больных раком молочной железы при использовании qRT-PCR [7]. Изменения в экспрессии miR-4417 выявлены в 70,1 % наследственного и не наследственного рака молочной железы. При этом miRNA анализировали в фиксированных в формалине и залитых парафином образцах опухолевой ткани с применением qRT-PCR [8]. miR-665 и miR-4417 являются межгенными и кодируются в хромосоме 14 и 1 соответственно. miR-665 кодируются в общем кластере с несколькими другими miRNA (miR-127, miR-136, miR-337, miR-431, miR-432, miR-433, miR-493). Изменения в экспрессии остальных представителей этого кластера выявлены при различных онкологических заболеваниях. MiRNA одного кластера могут как все вместе экспрессироваться, так и независимо друг от друга. miR-665 имеет сайты связывания с 3'UTR mRNA онкогена AKAP13, mRNA онкосупрессора PPARD и в CDS mRNA онкогена GLI2. miR-4417 имеет сайт связывания в 5'UTR mRNA онкогена STYK1 и в CDS mRNA онкосупрессора AKAP12. Так как эти гены-мишени, участвующие в развитии рака молочной железы являются либо онкогенами, либо онкосупрессорами, то изменения в их экспрессии найдены и при других онкологических заболеваниях [16]. В результате исследований показано, что miR-665 и miR-4417 являются перспективными диагностическими маркерами рака молочной железы.

Литература

- 1 Jochelson M., Hayes D.F., Ganz P.A. Surveillance and monitoring in breast cancer survivors: maximizing benefit and minimizing harm // *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 2013. – Vol.12. – P. 13–18.
- 2 Eberts E.M. The early diagnosis of cancer of the breast // *Can. Med. Assoc J.* 1934. – Vol. 31. – No. 1. – P. 9–14.
- 3 Simon K. Studies of diagnosis and prognosis of breast carcinoma from serum findings // *Med. Monatsschr.* 1957. – Vol. 11. – No. 12. – P. 794–800.
- 4 Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer // *Cancer Res.* 2005. – Vol. 65. – No. 16. – P. 7065–7070.
- 5 Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // *Science.* 2001. – Vol. 294. – No. 5543. – P. 853–858.
- 6 Ramalingam P., Palanichamy J.K., Singh A., Das P., Bhagat M., Kassab M.A. et al. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing // *RNA.* 2014. – Vol. 20. – No. 1. – P. 76–87.
- 7 Si H., Sun X., Chen Y., Cao Y., Chen S., Wang H., Hu C. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer // *J. C. Res. Clin. Oncol.* 2013. – Vol. 139. – No. 2. – P. 223–229.
- 8 Murria E.R., Palanca S.S., de Juan J.I., Egoavil R.C., García-Casado Z., Juan F.M. et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer // *J. Breast C. Res. Treat.* 2013. – Vol. 142. – No. 1. – P. 19–30.
- 9 Borgan E., Navon R., Vollan H.K., Schlichting E., Sauer T., Yakhini Z. et al. Ischemia caused by time to freezing induces systematic microRNA and mRNA responses in cancer tissue // *Mol. Oncol.* 2011. – Vol. 5. – No. 6. – P. 564–576.
- 10 Addou-Klouche L., Adélaïde J., Cornen S., Bekhouche I., Finetti P., Guille A. et al. Integrated genomic analysis of breast cancers // *Balk. J. Med. Genet.* 2012. – Vol. 15. – P. 71–74.
- 11 Li Q., Li X., Guo Z., Xu F., Xia J., Liu Z. et al. MicroRNA-574-5p was pivotal for TLR9 signaling enhanced tumor progression via down-regulating checkpoint suppressor 1 in human lung cancer // *PLoS One.* 2012. – Vol. 7. – No. 11. – P. 48278.
- 12 Yang M., Liu R., Sheng J., Liao J., Wang Y., Pan E. et al. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma // *Oncol. Rep.* 2013. – Vol. 29. – No. 1. – P. 169–176.
- 13 Ji S., Ye G., Zhang J., Wang L., Wang T., Wang Z. et al. miR-574-5p negatively regulates Qki6/7 to impact β -catenin/Wnt signalling and the development of colorectal cancer // *Gut.* 2013. – Vol. 62. – No. 5. – P. 716–726.
- 14 Fan M., Li X., Jiang W., Huang Y., Li J., Wang Z. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells // *Exp. Ther. Med.* 2013. – Vol. 5. – No. 4. – P. 1143–1146.
- 15 Guo L.H., Li H., Wang F., Yu J., He J.S. The Tumor suppressor roles of miR-433 and miR-127 in gastric cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. – Vol. 14. – P. 14171–14184.