

**REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

ISSN 2224-5227

Volume 6, Number 304 (2015), 133 – 143

UDC [616-092+616-006.6]-07:577.213/.217

**REGULATORY MECHANISMS OF MICRORNA ACTIONS
AS A BIOMARKER OF EARLY DIAGNOSIS AT PATHOLOGIES**

M.G. Orazgaliyeva, A.M. Nussupbekova, A.S. Amirkov, Sh.A. Beysembayeva, M. Rysuly

adaipcr@gmail.com

Kazakh National Medical University after S.D. Asfendiyarov, Almaty,

Key words: microRNA, early diagnosis, oncology

Abstract. MicroRNAs are small (22-25 nucleotides) non-coding RNAs that control gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels in mammals, plants, viruses, bacteria, etc. Regulation of expression of the target gene occurs by breaking the corresponding mRNA or by inhibition of its translation. Thus, microRNAs regulate processes in the immune system, cell proliferation, differentiation, cell cycle, apoptosis, and the appearance of tumor suppression, etc. The mechanisms of action of miRNAs is still not fully understood. The study of already known microRNAs, identifying new microRNAs allows us to consider a miRNA as a new biomarker for early diagnosis and perhaps therapy of cancer and other pathological conditions in clinical practice. In many disease states found abnormalities in the expression of miRNAs. The publicly accessible databases of miRNAs contains information about the connection between human miRNAs and the various diseases. The first explored human disease that has been associated with impaired functioning of miRNAs become certain types of cancer.

УДК [616-092+616-006.6]-07:577.213/.217

**РЕГУЛЯТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МИКРОРНК,
КАК БИОМАРКЕРА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ**

М.Г. Оразгалиева, А.М. Нусупбекова, А.С. Амирбеков, Ш.А. Бейсембаева, М. Рысулы

Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, г.Алматы,

Ключевые слова: микроРНК, ранняя диагностика, онкология

Аннотация. МикроРНК – это небольшие (22-25 пар нуклеотидов) некодирующие РНК, которые контролируют генную экспрессию на уровне транскрипции и на посттранскрипционном уровне у млекопитающих, растений, вирусов, бактерий и т.д. Регуляция экспрессии целевого гена происходит путем разрушения соответствующей мРНК и/или ингибиции ее трансляции. Таким образом, микроРНК регулируют процессы, происходящие в иммунной системе, пролиферацию клеток, их дифференциацию, клеточный цикл, апоптоз, возникновение и супрессию опухолей и др. Механизмы действия микроРНК еще не до конца изучены. Исследование уже известных микроРНК, выявление новых микроРНК позволяет рассматривать микроРНК в качестве нового биомаркера ранней диагностики и, возможно, терапии рака и других патологических состояний в клинической практике. При многих болезненных состояниях обнаружены отклонения в экспрессии микроРНК. В публично доступных базах данных по микроРНК собрана информация о связи между нарушениями в работе микроРНК и различными заболеваниями. Первыми исследованными заболеваниями человека, с которыми была установлена связь с нарушением функционирования микроРНК стали некоторые типы рака. Впоследствии такие микроРНК называли онкомирами.

С точки зрения терапии исследование возможностей микроРНК также представляет интерес.

Введение

Современная медицина особое внимание уделяет двум перспективным областям: диагностике заболеваний и генной терапии. Несмотря на существенные достижения в диагностике ряда патологий, проблемы раннего выявления онкологических заболеваний по-прежнему актуальны для медицинской

науки и практики. Сегодня описан большой класс малых РНК, названный микроРНК, который может обеспечить прорыв и в диагностике заболеваний и в генной терапии. Несмотря на то, что микроРНК описаны всего несколько лет назад, они стали наиболее важными регуляторами активности генов на посттрансляционном уровне. В человеческом организме, начиная с эмбриональной стадии, они направляют процессы клеточной дифференцировки, как бы решая, каким клеткам образовывать почечную ткань, а каким — спинномозговую. МикроРНК участвуют в управлении ростом, старением и отмиранием клеток. Согласно данным литературы, микроРНК регулируют экспрессию более чем 30% генов, кодирующих структуру белков [1]. Эти молекулы играют важную роль в метаболических и биологических процессах, несмотря на то, что функции большинства из идентифицированных микроРНК остаются не установленными. Последние исследования показали, что существует уникальный профиль экспрессии микроРНК в разных опухолях на различных стадиях развития. Такие ткань-специфические профили экспрессии микроРНК могут выполнять важные функции при многих заболеваниях и вирусных инфекциях. Предполагают, что микроРНК могут служить новыми биомаркерами в диагностике многих заболеваний.

История изучения, биогенез и регуляторные механизмы микроРНК. Впервые микроРНК были охарактеризованы группой ученых под руководством V. Ambros из Гарвардского университета в 1993 г. [2]. Сначала была установлена мутация у нематод *Caenorhabditis elegans*, которая приводила к нарушению превращения куколки во взрослое животное. После длительного исследования белка, ответственного за развитие этого феномена, исследователями была обнаружена малая некодирующая белок РНК, названная lin-4, которая была необходима для развития фенотипа данной мутации. Дальнейшие исследования показали, что lin-4 отрицательно контролирует экспрессию гена lin-14 с помощью присоединения к 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) lin-14 тРНК через несмысловое взаимодействие РНК-РНК [3, 4]. Важные функции микроРНК оставались неизвестными до открытия другой микроРНК (let-7), выявленной у множества организмов, и открытия большого класса похожих малых РНК у *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* и у человека [5-8]. С тех пор исследования микроРНК стали одной из наиболее актуальных тем в биологии и медицине. МикроРНК присутствуют и функционируют во всех биологических и метаболических процессах эукариот.

МикроРНК являются классом малых РНК длиной 19-24 нуклеотидов, которые не кодируют синтез белка. Большинство генов микроРНК транскрибируются РНК-полимеразой II (Pol II), в результате получается петля первичной микроРНК (pri-miРНК), при этом длина первичных микроРНК колеблется от нескольких десятков до более тысячи нуклеотидов [9]. Кроме того, некоторые микроРНК транскрибируются РНК-полимеразой III [10, 11]. Около 40 процентов локусов микроРНК присутствуют в инtronной области и около 10 процентов в экзонной области некодирующих транскриптов, и приблизительно 40 процентов локализованы в интранах белок-кодирующих генов, остальные гены микроРНК расположены в других регионах [6]. Альтернативный сплайсинг определяет, где окажется микроРНК — в интроне или экзоне. МикроРНК с 5' и 3' поли(A)концами может пройти сплайсинг так же, как мРНК [12]. МикроРНК млекопитающих в основном закодированы в интранах, они предположительно проходят сплайсинг до процессинга микроРНК. Pri-микроРНК обрабатываются в ядре с помощью ряда белков, называющихся "микропроцессоры", основные из них: фермент РНКазы III, Drosha, double-stranded RNA binding (dsRBD) (белок связывания двухцепочечной РНК) и кофактор DGCR8/Pasha (рис. 1) [13, 14].

Этот комплекс разрезается на предшественники миРНК с приблизительно 70-нуклеотидной стеблопетлевой структурой. Предшественники миРНК с вторичной структурой транспортируются в цитоплазму транспортером экспортин 5, этот процесс является Ran-GTP- зависимым [15, 16]. Далее, в цитоплазме предшественники миРНК процессируются в 19-24- нуклеотидные зрелые двухцепочечные миРНК/миРНК-комплексы с помощью другого фермента РНКазы III, названного Dicer, вместе с его dsRBD-партнером TRBP [17, 18]. В клетках человека, TRBP связывается с белком Argonaute (AGO2) и сразу после этого с Dicer с образованием тримерного комплекса. Это инициирует сборку РНК-индукцированного сайленс комплекса (RISC) - рибонуклеопротеинового комплекса, который приводит к деградации мРНК [19, 20]. Нити миРНК с более низкой стабильностью спаривания оснований с 5'конца включены в RISC комплекс, а другая нить, как правило, деградирует.

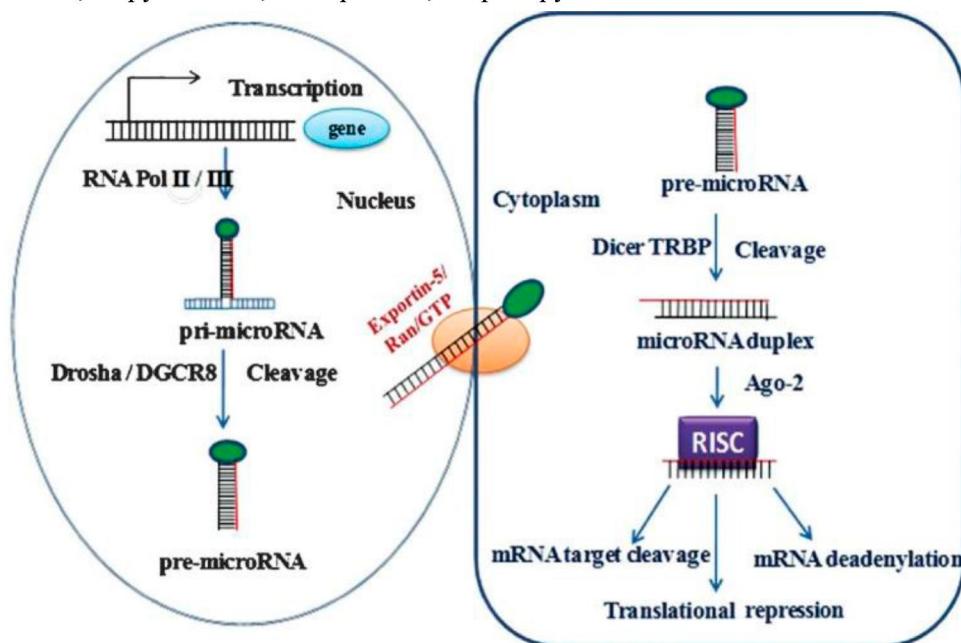


Рисунок 1 - Биогенез миРНК [9]

После включения в RISC, миРНК направляет комплекс к целевой РНК для взаимодействия парных оснований. МиРНК идеально или почти идеально комплементарна к мРНК, после связывания происходит расщепление и деградация мРНК или подавляется трансляция мРНК. RISC комплекс содержит белок AGO2, способный к эндонуклеолитическому расщеплению. Большинство миРНК млекопитающих не идеально комплементарны целевым мРНК, что стимулирует репрессию трансляции, а не расщепление и деградацию [21-23]. В случае репрессии трансляции, целевая мРНК не деградирует; точные механизмы репрессии трансляции с помощью миРНК по-прежнему остаются до конца не изученными, но одним из возможных механизмов может быть ингибирование комплексом миРНК-RISC процессов инициации и/или элонгации трансляции белка путем взаимодействия с различными трансляционными факторами, такими как eIF4F. Кроме того, показано, что миРНК воздействуют на экспрессию генов путем направленного разрушения мРНК с помощью деаденилирования РНК-мишеней, которое полностью отличается от нормальной репрессии трансляции и/или прямой деградации мРНК. Известно, что 3'поли(A)хвосты и 5'головки очень важны для обеспечения стабильности мРНК и препятствуют разрушению последних. После того как миРНК приводит к удалению 3'поли(A)хвоста и 5'головки у мРНК-мишени, наступает быстрое разрушение такой мРНК клеточными ферментами. В большинстве случаев миРНК присоединяется к мРНК-мишени на 3'UTR с многочисленными участками. Однако миРНК, направленная на 3'UTR и/или открытую считывающую рамку, также может репрессировать генную экспрессию. Первично миРНК взаимодействуют 6-8 нуклеотидами на своем 5'конце с мРНК-мишенью. Эта область

микроРНК получила название «*seed*»-области (от англ. seed – семя, зерно) и является высоко консервативной для одного семейства микроРНК у разных видов [24]. Указанная особенность используется для разработки различных компьютерных программ с целью создания новых микроРНК и поиска их мишней.

Существует много общего между микроРНК и другими РНК, особенно малыми РНК. Для того чтобы РНК была отнесена к классу микроРНК, она должна иметь следующие характеристики: все зрелые микроРНК образуются из длинных предшественников микроРНК вследствие множества превращений; предшественники микроРНК могут быть преобразованы во вторичные шпилечные структуры с высокоотрицательной минимальной структурной свободной энергией; микроРНК расположены внутри одного плеча вторичной шпилечной структуры; не имеется внутренних петель или выпячиваний в комплексе микроРНК/микроРНК. В микроРНК допускается небольшое количество несовпадений, но имеется, по меньшей мере, 16 совпадающих пар оснований в комплексе микроРНК/микроРНК. Некоторые микроРНК весьма консервативны для разных видов, хотя не существует универсальных характеристик для всех микроРНК. Имеется также много видоспецифичных микроРНК. Перечисленные критерии для идентификации микроРНК касаются их биогенеза. Кроме критериев биогенеза при разработке новых микроРНК необходимо наличие как минимум одного из следующих критериев: микроРНК должны экспрессироваться и определяться, по крайней мере, в одном органе или ткани общепринятыми методами молекулярной биологии – нозернблоттинг, микроплатформы и/или ПЦР в реальном времени; экспрессия микроРНК изменяется при сниженнной экспрессии ферментов биогенеза микроРНК – Dicer и Drosha.

В последние 7 лет резко возросло внимание к проблеме микроРНК, что подтверждается множеством публикаций в различных журналах. Несмотря на то, что первая микроРНК была идентифицирована в 1993 г., их функции оставались неизвестными до начала XXI в., когда они были определены у представителей трех различных видов. В настоящее время для человека описано более 700 микроРНК, а применение компьютерных программ позволило предсказать наличие более 1 000 генов микроРНК в геноме человека. Одна микроРНК может регулировать работу сотни генов, и почти 80% генома человека находится под их регуляцией [25, 26]. И напротив, один ген может регулироваться десятками микроРНК, таким образом, получается встречная комбинаторика. Именно эти механизмы могут объяснить различия (в регуляторных потенциалах геномов) между человеком и шимпанзе, ДНК которых совпадают на 98%. МикроРНК лежат в основе различий реакций головного мозга мужчин и женщин, особенностей организмов человеческих рас и народностей, и, что важно, deregulation работы микроРНК формирует картины почти всех патологий: сердечно-сосудистых, онкологических, диабетов, ожирения. МикроРНК широко распространены в организме эукариот и у некоторых вирусов. Они регулируют экспрессию более 30% генов, кодирующих информацию о структуре белков, что делает их одними из наиболее важных генных регуляторов [27]. Наш организм содержит 10^{14} клеток. Раньше считалось, что РНК за пределы клетки не выходят, а за межклеточные информационные связи отвечают гормоны. Но выяснилось, что клетки адресуют друг другу крошечные пузырьки, везикулы, а в везикулы заключена генетическая информация в форме микроРНК. Клетки и ткани обмениваются адресными сигналами не только на гормональном, но и на более тонком уровне, и это связь двухсторонняя. В ответ на "команду" одних клеток другим реакцией может быть не только её исполнение, но и встречный отклик. И наконец, микроорганизмы, что живут в наших тканях и органах, тоже могут воздействовать на экспрессию генов посредством своих микроРНК.

Микро РНК как маркер диагностики рака

Впервые участие микроРНК в развитии онкологических заболеваний было показано для двух генов микроРНК miR-15 и miR-16, расположенных в хромосомной области 13q14. Наблюдалась частая делеция или репрессия этих генов у 68% пациентов с хронической В-лимфоцитарной лейкемией [29]. Последующие исследования показали, что в большинстве случаев многие формы онкопатологии (рак легких, лейкемия, рак молочной железы и мозга) имеют альтернативный профиль экспрессии микроРНК по сравнению с нормальными соответствующими тканями. Получены важные данные о том, что раковая инвазия и метастазирование инициируются микроРНК [28-31].

В практическом здравоохранении важным преимуществом использования скрининга

микроРНК в диагностике рака является ранняя и более эффективная диагностика онкологических заболеваний. Циркулирующие микроРНК, как показывают исследования, могут стать одними из самых перспективных биомаркеров для ранней диагностики рака [32]. Внутри клетки микроРНК упакованы в экзосомы или микровезикулы, которые затем выходят из клеток и попадают в кровь. Циркулирующие микроРНК обладают высокой стабильностью, что делает их идеальными кандидатами, служащие в качестве ранних диагностических маркеров рака [33]. К примеру, для диагностики колоректального рака в настоящее время используют либо инвазивные методы, такие как колоноскопия, или гораздо менее точные методы, такие как анализ кала. Во многих случаях, нежелание выполнять такие процедуры, в конечном счете, приводит к более поздней диагностике у большого количества пациентов [34]. Исследуя ткани и кровь пациентов с различными стадиями колоректального рака, Yong и др. показал в своей работе, что уровень семи микроРНК изменился и в крови и в ткани, а для трех микроРНК имеются сильные положительные корреляции между образцами крови и тканей: микроРНК-193а-3р, микроРНК-23а и микроРНК-338-5р. Интересно, что уровень каждой микроРНК увеличивается, при прогрессировании стадии рака, тем самым подчеркивая важную роль этого трио для диагностики [34].

Для некоторых заболеваний, таких как колоректальный рак, рак предстательной железы, существуют некоторые неясности и трудности внутри методологии диагностики. Наиболее часто используемым методом диагностики рака предстательной железы является шкала Глисона. Согласно этой шкале опухоли дифференцируются в зависимости от размера и гистологических особенностей. Однако для этого метода существует определенная серая зона, из-за которой возникают определенные трудности с выбором правильного курса лечения. Использование микроРНК для классификации подтипов рака простаты может перестроить систему Глисона и представить более точную и надежную систему диагностики. Для решения этой проблемы, Wach и др. провели скрининг двух выборок больных раком предстательной железы. Они обнаружили, что уровень четырех микроРНК - микроРНК-143, микроРНК-145, микроРНК-200с и микроРНК-375 наиболее сильно изменился в обеих группах. Из этих четырех микроРНК для микроРНК143, 145 и микроРНК-375 были показаны лучшие различия между злокачественными и доброкачественными опухолями. Сочетание всех трех микроРНК позволяло правильно различать злокачественные и доброкачественные образцы в 77,6% случаев [35].

Для тех типов рака, которые уже имеют стандартный метод характеристики подтипов, исследователи могут разработать скрининг микроРНК как молекулярных маркеров, используемых для диагностики, например, как это было сделано Leivonen др. для двух групп пациентов с HER2 позитивным раком молочной железы. Было найдено широкое разнообразие микроРНК, подавляющих HER2, а также сильная корреляция между высоким уровнем микроРНК-342-5р и временем выживания [36]. Таким образом, подобные характеристики микроРНК могут быть установлены для различных подтипов рака, что предполагает терапевтические возможности использования микроРНК, кроме уже существующих практических возможностей диагностики.

Механизм действия микроРНК в опухоли

Процесс развития раковой опухоли предполагает комбинированное взаимодействие и опухолевых супрессоров и индукторов рака. МикроРНК, согласно данным литературы, может функционировать как новый класс онкогенов и генов-супрессоров опухолей [37]. Предполагают, что микроРНК с повышенной экспрессией в опухолях функционируют как онкогены, такие микроРНК называют oncomirs. Они негативно ингибируют гены-супрессоры опухоли и/или гены, контролирующие дифференцировку клеток или апоптоз, тем самым способствуя развитию опухоли. В отличие от микроРНК- oncomirs, для других микроРНК показано снижение экспрессии в раковых клетках, они действуют как гены-супрессоры опухолей. МикроРНК-супрессоры опухолей обычно предотвращают развитие опухоли, отрицательно ингибируя онкогены и/или гены, которые контролируют дифференцировку клеток или апоптоз. МикроРНК let-7 высоко консервативна и является одним из основных членов семейства микроРНК [37]. Let-7 локализован в хромосомном регионе, который, как правило, удален в раковых клетках человека. Наиболее высокий уровень экспрессии let-7 встречается в дифференцированных тканях взрослого человека и отклонение от нормального уровня его экспрессии ведет к потере дифференциации и онкогенезу. Семейство микроРНК let-7 подавляется во многих опухолях, включая рак легких и молочной

железы [38]. Многие из членов let-7 семейства микроРНК находятся в нестабильных геномных областях, связанных с раком легкого, молочной железы и шейки матки. Кроме того, некоторые члены семейства микроРНК let-7 функционально ингибируют мРНК хорошо охарактеризованных онкогенов, таких как семейство Ras[39], HMGA2 [40] и C-Myc [40], индуцируют апоптоз и остановку клеточного цикла путем избыточной экспрессии при раке легких, раке толстой кишки в клеточных линиях лимфомы Беркитта[40, 41]. Аналогичным образом, гены микроРНК-15а и микроРНК-16-1 расположены в регионе хромосомы 13q14, который уделяется в большинстве случаев хронического лимфолейкоза[42]. Целевым геном для микроРНК-15а является Bcl2, ген анти-апоптоза, таким образом, потеря микроРНК-15а и микроРНК-16-1in в В-клетках могут привести к ингибированию апоптоза, что приводит к появлению злокачественных опухолей [43]. Кроме того, эти микроРНК избыточно экспрессируются в опухоли поджелудочной железы. Изменение экспрессии микроРНК-16-1 негативно регулирует рост клеток и прогрессию клеточного цикла, а также индуцирует апоптоз в нескольких клеточных линиях рака человека [43]. Кроме того, для членов семейства микроРНК-29 было показано подавление экспрессии при хроническом миелолейкозе (ХМЛ), раке легких, инвазивном раке молочной железы, остром миелоидном лейкозе (ОМЛ), и холангiocарциноме[42,43,44,45,46]. Экспрессия микроРНК-34а подавляется в опухолях глиомы человека, что делает микроРНК-34а потенциальным кандидатом на роль опухолевого супрессора при опухолях головного мозга, механизм действия которого заключается в регулировании нескольких онкогенных путей и индукции дифференциации раковых стволовых клеток [47].

Интересно, что микроРНК, продемонстрировавшие важную роль в подавлении опухоли, такие как микроРНК-15а / 16-1, микроРНК-29, let-7, присутствуют не в одном месте генома и на самом деле могут регулироваться по-разному. В клетках HeLa, в то время как продукт хромосомного локуса 7q32 микроРНК-29b-1/микроРНК-29a активно транскрибируется для создания зрелой микроРНК-29b, транскрипция микроРНК-29b-2/микроРНК-29c локуса на хромосоме 1q23 прекращается[48]. Наблюдаемая избыточность геномных копий микроРНК может быть способом обеспечить эволюционное преимущество, обеспечивая функцию в ситуациях, когда один аллель утерян или выключен. При этом зрелые микроРНК идентичны, даже если они получены из различных предшественников.

МикроРНК-155 была впервые описана как опухолевый онкоген [49,50], когда был установлен высокий уровень экспрессии этой микроРНК в лимфоме Беркитта, при болезни Ходжкина[51], первичной медиастинальной неходжкинской лимфоме[50, 51], ХМЛ, раке легкого [52] и раке молочной железы [53]. МикроРНК-155 локализуется в некодирующй области в рамках кластера интеграции В-клеток (B cell integration cluster - BIC) на хромосоме 21q23, который взаимодействует с c-Myc в онкогенезе. При культивировании *in-vitro* фибробластов куриных эмбрионов, когда происходит коэкспрессия BIC и c-Myc, с использованием репликации компетентных ретровирусных векторов, наблюдается повышение роста культуры клеток[48]. Информация о механизме избыточной экспрессии микроРНК-155/BIC при раке очень скучна. Существует положительная корреляция микроРНК-155 при остром миелоидном лейкозе, с высокими показателями FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) с tandemно дуплицирующимися (in tandem duplication -ITD) мутациями. Ингибитор FLT3, опосредованно блокирующий FLT3- ITD сигнализацию в лейкозных клетках человека не оказал никакого эффекта на уровень микроРНК-155, что говорит о FLT3-ITD независимую экспрессию микроРНК-155 [46]. При использовании в эксперименте модели трансгенных мышей с избыточной экспрессией микроРНК-155 в В-клетках, было очевидно распространение поликлональных прелейкемических пре-В-клеток, что сопровождалось полномасштабной малигнизацией В-клеток, тем самым демонстрируя роль микроРНК на ранних этапах возникновения и развитие лейкоза [54]. Критическая роль микроРНК-155 в дефектном функционировании дендритных клеток, нарушение секреции цитокинов, смещение Th клеток к Th2 дифференциации у мышей так же было продемонстрировано с использованием линий мышей с нокаутом гена[55].

Множество доказательств, демонстрирующих на положительную регуляцию микроРНК-21 для некоторого количества гематологических злокачественных опухолей, таких как ОМЛ (острый миелоидный лейкоз)[46, 51], ХМЛ (хронический миелоидный лейкоз) и солидных опухолей,

включая глиобластомы, рак печени, поджелудочной железы, простаты, желудка, толстой кишки, легких, молочной железы, [56,57, 58], и т.д. убедительно свидетельствуют в пользу его роли в качестве онкогена. Анти-смыслое опосредование выключение экспрессии микроРНК-21 в культуре глиобластомы и рака печени клеток молочной железы, вызывает торможение роста клеток и вызывает активацию каспаз, связанных с повышением апоптоза[58, 59], путем целевой активации генов-супрессоров опухолей, таких как PTEN (phosphataseandtensinhomolog - гомолог фосфатазы и тенсина) [59], Pdcd4 (programmedcelldeath 4 – ген программированной клеточной смерти 4) [59], и TPM1 (tropomyosin 1 - тропомиозин 1) [60].

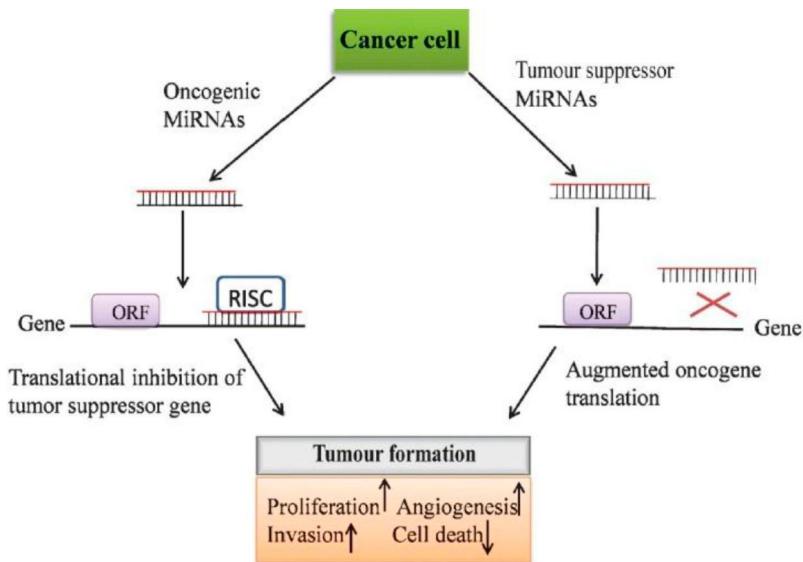


Рисунок 2 - МикроРНК как онкоген и опухолевый супрессор[9]

Согласно литературным данным, можно предположить, что экспрессия отдельных микроРНК регулируется хорошо отлаженным посттранскрипционным механизмом. Кроме того, многочисленные данные также подтверждают роль супрессора опухоли для некоторых микроРНК, которые противоречат более ранним данным, показывающие стабильно положительную регуляцию этих микроРНК в онкогенезе. Эта двойная роль (онкоген и опухолевый супрессор) была также описана для белок-кодирующих генов, вовлеченных в патогенез рака, таких как TP53 [61]. Таким образом, возможно, что микроРНК в зависимости от транскриптома, от ткани, также от целевых для микроРНК генов, может действовать или как онкоген или как супрессор опухоли. К примеру, при скрининге микроРНК, связанных с онкогенами клеточной трансформации, были определены две микроРНК: микроРНК-372 и микроРНК-373. Эти микроРНК непосредственно ингибируют экспрессию гена опухолевого супрессора LATS2, индуцируют пролиферацию и онкогенез совместно с Ras путем нейтрализации гена TP53 дикого типа [62]. В таблице 1 суммированы некоторые микроРНК характеризующиеся как онкогены или супрессоры опухолей[9].

Таблица 1- Профиль экспрессии микроРНК при различных видах рака [9].

Тип рака	МикроРНК, ассоциированные с раком	Статус экспрессии
Рак груди	микроРНК-191, микроРНК-454, микроРНК-10а, микроРНК-374а, микроРНК-10б, микроРНК-218, микроРНК-140-3р, микроРНК-126, микроРНК-145, микроРНК-let7-g, микроРНК-125а-5р, микроРНК-125б, микроРНК-126	Понижен
	микроРНК-373, микроРНК-9, микроРНК-499-3р, микроРНК-330-5р, микроРНК-21, микроРНК-155, микроРНК-23, микроРНК-191	Повышен
Рак яичников	микроРНК-200а, микроРНК-200с, микроРНК-141	Повышен
	микроРНК-199а, микроРНК-140, микроРНК-145, микроРНК-125b1	Понижен
Рак прямой кишки	микроРНК-135, микроРНК-21, микроРНК-156, микроРНК-181b, микроРНК-191, микроРНК-200с	Повышен
	микроРНК-143, микроРНК-145, микроРНК-133b, микроРНК-126	Понижен

Острый миелоидный лейкоз	микроРНК-Has-191, микроРНК-199а, микроРНК-155	Повышен
Хронический миелоидный лейкоз	микроРНК-17-5р, микроРНК-17-3р, микроРНК-18а, микроРНК-19а, микроРНК-19b-1, микроРНК-20а, микроРНК-92а-1	Повышен
Хронический лимфолейкоз	микроРНК-195, микроРНК-331, микроРНК-34а, микроРНК-21, микроРНК-155	Повышен
	микроРНК-15а, микроРНК-16, микроРНК-29, микроРНК-143, микроРНК-45, микроРНК-30d, микроРНК-let7a, микроРНК-181а	Понижен
Рак пищевода	микроРНК-194, микроРНК-192, микроРНК-200с	Повышен
Рак желудка и кишечника	микроРНК-106b-25	Повышен
	микроРНК-15b, микроРНК-16	Понижен
Рак легких	микроРНК-17-92	Повышен
	микроРНК-let-7	Понижен
Рак крови	микроРНК-29с, микроРНК-26а, микроРНК-30с, микроРНК-30e-5р, микроРНК-145, микроРНК-30a-3р, микроРНК-133а, микроРНК-133b, микроРНК-195, микроРНК-125b, микроРНК-199а	Понижен

Сегодня данные об экспрессии микроРНК при онкопатологии изложены во многих работах. Суммируя эти сведения, можно заключить, что для каждого типа рака аберрантно экспрессированы как минимум две микроРНК. Возможна либо повышенная экспрессия отдельных микроРНК, при этом микроРНК функционирует как онкоген, либо сниженная экспрессия, и при этом микроРНК выступает как ген, супрессирующий развитие опухоли. Важно также то, что некоторые микроРНК имеют различный профиль экспрессии при разных типах рака [31]. Более того, по мере развития опухоли меняется и профиль экспрессии микроРНК. Накопленные знания позволяют рассматривать микроРНК в качестве нового биомаркера ранней диагностики рака в клинической практике. Применение микроРНК явилось существенным достижением в характеристике низкодифференцированных новообразований, примером чего явилось создание нового метода оценки профиля экспрессии микроРНК с помощью проточной цитометрии (с использованием меченых частиц) для анализа 17 низкодифференцированных опухолей. При этом точность анализа была очень высокой и позволила идентифицировать гистологически недифференцируемые новообразования. В литературе описано множество исследований, которые еще раз подтверждают вышеизложенное, интересующийся читатель легко найдет эти данные.

Несмотря на то что многие исследования убедительно доказали возможность применения профиля экспрессии микроРНК для идентификации и классификации малодифференцированных опухолей, многое еще предстоит сделать для применения этой методики в клинической практике. Сегодня большинство исследований направлено на сравнение профилей экспрессии микроРНК в опухолевой и соответствующей здоровой ткани, но не менее перспективным является определение профилей экспрессии микроРНК в разных субтипах опухолей. Метод проточной цитометрии микроРНК с использованием микрочастиц был успешно применен для диагностики четырех субтипов рака молочной железы; метод ПЦР в реальном времени использовали для установления различных стадий рака яичника, молочной железы на основе профилей экспрессии микроРНК. Привлекательным подходом является исследование профиля экспрессии микроРНК в крови пациентов и выявление корреляций с профилями экспрессии микроРНК в опухолевой ткани. Такие исследования могут иметь неоценимое значение в ранней диагностике опухолей по анализу периферической крови.

МикроРНК как маркеры различных патологических состояний

Новые современные технологии, примененные к идентификации генов микроРНК и их мишней, такие как компьютерные программы, предсказывающие микроРНК и их мишени, ПЦР в реальном времени и микроРНК микроплатформы, позволяют лучше изучить и понять функции микроРНК. Все это свидетельствует о том, что микроРНК имеют значительный потенциал для клинического применения – в диагностике заболеваний и генной терапии. Изучается роль микроРНК в развитии различных заболеваний у человека, возможность их использования в качестве биомаркера для ранней диагностики и в терапии. Накапливается все больше доказательств важной роли микроРНК в генезе многих заболеваний: от рака и ВИЧ-инфекции до

метаболических нарушений. Открыты уникальные наборы микроРНК, специфичные для разных заболеваний, уникальная экспрессия микроРНК при определенных заболеваниях и, наконец, аберрантная экспрессия микроРНК при патологическом процессе. Кроме онкологических заболеваний, исследователями во всем мире рассматривается роль микроРНК в таких патологических состояниях организма, как сердечно-сосудистые заболевания, в том числе инфаркт миокарда, атеросклероз [63], воспалительные заболевания легких, астма, муковисцидоз [63], аутоиммунные болезни [64]. МикроРНК являются регуляторами при таких нарушениях обмена веществ, как дислипидемия, приводящая в дальнейшем ко многим патологическим состояниям организма [65]. Как и в случае онкологических заболеваний, при этом микроРНК может быть и активатором, и супрессором процесса, что делает ее не только перспективным маркером диагностики болезни, но и реальным кандидатом для терапии, после тщательного изучения сложного механизма регуляции в каждом конкретном случае заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] И.П. Кайдашев. Перспективы изучения и применения микроРНК в иммунологии и аллергологии, Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология, №7 (18) 2008 г
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75:843–54
- [3] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75:855–62.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901–6
- [5] Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5:396–400
- [6] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:126–39
- [7] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433:769–73.
- [8] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:4034–9
- [9] JavedAhmad, Seyed E, Hasnain, Maqsood A, Siddiqui, Maqsood Ahamed, Javed Musarrat, Abdulaziz A, Al-Khedhairy. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm. *Indian J Med Res*. 2013 Apr; 137(4): 680–694.
- [10] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23:4051–60
- [11] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13:1097–101.
- [12] Bracht J, Hunter S, Eachus R, Weeks P, Pasquinelli AE. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA*. 2004;10:1586–94.
- [13] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432:231–5
- [14] Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18:3016–27.
- [15] Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17:3011–6.
- [16] Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10:185–91
- [17] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436:740–4
- [18] Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006;25:522–32.
- [19] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123:631–40.
- [20] Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*. 2005;19:2979–90.
- [21] Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*. 2004;18:975–80
- [22] Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol*. 2005;7:719–23
- [23] Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*. 2006;20:1885–98.
- [24] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Bio*. 2007;23:175–205.
- [25] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15–20.
- [26] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92–05

- [27] Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 2006;38(Suppl):S8–13.
- [28] Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2014;11:145–156.
- [29] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26; 99(24):15524–9.
- [30] Wang J, Zhang K-Y, Liu S-M, Sen S. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules.* 2014;19(2):1912–1938.
- [31] Aaron L. Oom, Brock A. Humphries, and Chengfeng Yang
- [32] MicroRNAs: Novel Players in Cancer Diagnosis and Therapies *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 959461.
- [33] Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2014;11:145–156.
- [34] Wang J, Zhang K-Y, Liu S-M, Sen S. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules.* 2014;19(2):1912–1938.
- [35] Yong FL, Law CW, Wang CW. Potentially of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013;13, article 280
- [36] Wach S, Nolte E, Szczyrba J, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *International Journal of Cancer.* 2012;130(3):611–621.
- [37] Leivonen S-K, Sahlberg KK, Mäkelä R, et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. *Molecular Oncology.* 2014;8(1):93–104.
- [38] Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *CellCycle.* 2008;7:2493–9.
- [39] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408:86–9.
- [40] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007;21:1025–30.
- [41] Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007;67:9762–70.
- [42] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:903–6.
- [43] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:15524–9.
- [44] Cimmino A, Calin GA, Fabbi M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:13944–9.
- [45] Poy MN, Eliasson L, Krützfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004;432:226–30.
- [46] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene.* 2007;26:6133–40.
- [47] Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111:3183–9.
- [48] Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, et al. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle.* 2010;9:1031–6.
- [49] Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science.* 2007;315:97–100.
- [50] Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chrom Cancer.* 2004;39:167–9.
- [51] Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol.* 2005;207:243–9.
- [52] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Leva GD, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353:1793–801.
- [53] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9:189–98.
- [54] Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature.* 2006;439:283–8.
- [55] Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in Eμ-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7024–9.
- [56] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DA, et al. Requirement of BIC/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007;316:608–11.
- [57] Poy MN, Eliasson L, Krützfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004;432:226–30.
- [58] Ciaffre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1351–8.
- [59] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 2007;133:647–58.
- [60] Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an

- important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J BiolChem.* 2008;283:1026–33
- [61] Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) *J Biol Chem.* 2007;282:14328–36.
- [62] Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or antioncogene? *Genes Dev.* 1990;4:1–8.
- [63] Voorhoeve PM, Sage CL, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, et al. A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell.* 2006;124:1169–81
- [64] Amit Kishore, Jana Borucka, Jana Petrkova, Martin Petrek. Novel Insights into miRNA in Lung and Heart Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 259131.
- [65] Zigang Qu, Wenhui Li, and Baoquan Fu. MicroRNAs in Autoimmune Diseases *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 527895.
- [66] Elisabeth Smolle, Johannes Haybaeck. Non-Coding RNAs and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2014 Aug; 15(8): 13494–13513.

УДК [616-092+616-006.6]-07:577.213/217

ПАТОЛОГИЯЛARDЫң ЕРТЕ ДИАГНОСТИКАЛЫҚ БИОМАРКЕРІ РЕТИНДЕ, МИКРО РНҚ ӘРЕКЕТТЕРИН РЕТТЕУШІ ТЕТІКТЕР

М.Г. Оразалиева, А.М. Нусупбекова, А.С. Амирбеков, Ш.А. Бейсембаева, М. Рысулы

С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ Үлгітүк Медицина Университеті, Алматы қаласы

Тірек сөздер: микроРНҚ, ерте диагностика, онкология

Аннотация. МикроРНҚ – бұл сұтқоректілер, есімдіктер, вирустар, бактериялар мен т.б. транскрипциялық және транскрипциялықтан кейінгі деңгейдегі гендік экспрессияны қадағалайтын кішігірім (нуклеотидтердің 22-25 жұбы) кодтамайтын РНҚ-дар. Бұтіндік ген экспрессиясының жиіленуі барабар мРНҚ-ның бұзылуы мен/немесе оның трансляциясының баяулануы жолымен жүзеге асырылады. Осылайша, микроРНҚ иммундық жүйеде болып жатқан, жасушалардың пролиферациясы, олардың саралануы, жасушалық цикл, апоптоз, ісіктің пайда болуы мен тежелуі және т.с.с. үдерістерді реттейді. микроРНҚ-ның жүзеге асырылу тетіктері әлі де болса тольктай зерттелмеген. Осы кезге дейінгі белгілі микроРНҚ-ларды зерттеу, жаңа микроРНҚ-ларды анықтау микроРНҚ-ны ерте диагностикасының және де ықтималынша клиникалық тәжірибелегі қатерлі ісік терапиясының және басқа да патологиялық жағдайлардың жаңа биомаркері ретінде қарастыруға мүмкіндік береді. Ауру күйлерінің көбісінде микроРНҚ экспрессияның ауытқуы табылған. микроРНҚ бойынша көпшілікке қолжетімді мәліметтер базаларында микроРНҚ жұмысының бұзылуы мен түрлі аурулар арасындағы байланыстардың болуы туралы ақпараттар жинақталған. микроРНҚ қызметінің бұзылуымен байланыстырылған адам ауруларының ішіндегі алғашқы зерттеулер қатерлі ісіктің кейбір типтеріне тиесілі. Нәтижесінде бұндай микроРНҚ-ларды «онкомирлер» деп атайдын болды. Терапия түркесінан микроРНҚ мүмкіндіктерін зерттеу ерекше қызметтің тудырады.