

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 306 (2014), 88 – 0

**SPECIFICITY OF BINDING OF miRNAs AND mRNA
IN LARGE CELL LUNG CARCINOMA**

R. Y. Niyazova, O. A. Berillo, S. A. Atambayeva, A. T. Ivashchenko

National nanotechnology laboratory, al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: raiguln@mail.ru; devolia18@mail.ru; shara79@mail.ru; a_ivashchenko@mail.ru

Key words: gene, mRNA, miRNA, non-small-celled lung cancer, large cell lung carcinoma.

Abstract. Binding of human miRNAs with mRNAs of genes involved in the development of large cell lung carcinoma was studied. The miRNA binding sites were revealed in the 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNA of ASCL1, ACTA2, CDH1, CEACAM5, CHGA, HTRA1, SEMA3B, TTF1 genes with value $\Delta G/\Delta G_m$ equaled or more than 90 %. It was shown that miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-5p and miR-619-5p have binding sites in mRNAs of genes associated with large cell lung carcinoma. The obtained data about influence of miRNA on mRNA expression of the genes involved in tumorigenesis, promote the development of methods of early diagnostics of large cell lung carcinoma.

УДК 577.21

**СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЕЙ miRNA И mRNA
ПРИ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО**

Р. Е. Ниязова, О. А. Берилло, Ш. А. Атамбаева, А. Т. Иващенко

Национальная нанотехнологическая лаборатория,

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: ген, miRNA, mRNA, немелкоклеточный рак легкого, крупноклеточная карцинома легкого.

Аннотация. Изучена специфичность связывания miRNA¹ человека с mRNA генов при крупноклеточной карциноме легкого. Найдены сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA генов ASCL1, ACTA2, CDH1, CEACAM5, CHGA, HTRA1, SEMA3B, TTF1 с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ равной 90% и более. Выявлены сайты связывания miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-5p, miR-619-5p с mRNA генов, экспрессия которых меняется при крупноклеточной карциноме легкого. Полученные результаты влияния miRNA на экспрессию генов, участвующих в онкогенезе, способствуют разработке методов ранней диагностики крупноклеточной карциномы легкого.

Немелкоклеточный рак легкого (non small cell lung cancer, NSCLC), одна из ведущих причин смерти от рака, представляет собой гетерогенную группу новообразований, включающую в основном субтипы: плоскоклеточный рак (SCC), adenокарциному (AC) и крупноклеточную карциному (LCC). Профиль экспрессии генов при LCC слабо отличим от профиля экспрессии генов при AC, но хорошо отличим при SCC. LCC составляет небольшой процент (9,8%) случаев немелкоклеточного рака легкого [1]. LCC относится к недифференцированным опухолям, развивается обычно в субсегментарных бронхах, рано метастазирует в лимфатические узлы средостения, плевру, надпочечники, головной мозг, кости. Этот субтип рака характеризуется повышенной степенью злокачественности. На основании изучения морфологических, клинических и иммуногистохимических показателей, выделены следующие подсубтипы LCC: классический LCC встречается у 54,8% больных; светлоклеточный у 29,8%; нейроэндокринный у 6,0%;

¹ Сокращения: mRNA - матричная РНК; miRNA - микроРНК; 3'UTR - 3'-нетранслируемая часть mRNA; 5'UTR - 5'-нетранслируемая часть mRNA, CDS - белок-кодирующая часть mRNA.

гигантоклеточный у 4,8%; комбинированный у 4,8% больных. Все подсубтипы LCC имеют трудноразличимую форму развития [1, 2].

miRNA регулируют экспрессию генов и являются участниками многих патологических процессов. Известно, что концентрация miRNA изменяется при онкологических заболеваниях [3, 4]. Имеющиеся данные подтверждают, что miRNA могут служить эффективными маркерами в диагностике и лечении рака легкого [5]. Экспрессия miRNA может изменяться по разному в процессе развития каждого субтипа опухоли на разных стадиях [6]. Чтобы достичь большей предсказательной силы установления субтипа опухоли по miRNA, необходимо найти гены-мишени для этой miRNA и выявить корреляцию в изменении экспрессии гена-мишени и miRNA при данном субтипе.

Поскольку молекулярно-генетические основы развития LCC остаются недостаточно изученными, отсутствует специфическая диагностика и целевая терапия этого субтипа рака легкого, то представляется важным установить, имеется ли специфичность в связывании miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа LCC. Для достоверной специфической диагностики субтипов и подсубтипов рака легкого необходимо установление ассоциаций нескольких пар miRNA с mRNA.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности mRNA генов человека получены из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием компьютерной программы Lextractor002 (<http://sites.google.com/site/malaheenee/software>). miRNA взяты из miRBase (<http://mirbase.org>). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили, используя программу MirTarget [7]. Рассчитано отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG - свободная энергия гибридизации, ΔG_m равно свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отбирали с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ равной 90% и более. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида mRNA.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных нами исследований установлены связи между некоторыми парами miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии субтипа LCC. Эти гены являются мишениями для ряда miRNA. Найдены сайты связывания с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ равной 90% и более для некоторых miRNA с mRNA генов *ASCL1*, *ACTA2*, *CDH1*, *CEACAM5*, *CHGA*, *HTRA1*, *SEMA3B*, *TTF1*, экспрессия которых изменяется при LCC. Сайты связывания изученных miRNA локализованы в 5'UTR (14%), CDS (59%) и 3'UTR (27%) mRNA. Наибольшее количество сайтов связывания с высоким сродством выявлено в CDS mRNA генов-мишеней. С высокой эффективностью ($\Delta G/\Delta G_m \geq 90\%$) связываются miR-6834-3p с mRNA гена *ACTA2*, miR-7160-3p, miR-1273g-3p и miR-1273h-5p с mRNA *CDH1*, miR-1285-5p с mRNA *CEACAM5*, miR-4487 и miR-6886-3p с mRNA *CHGA*, miR-4792 с mRNA *HTRA1*, miR-2861 с mRNA *SEMA3B* и miR-619-5p с mRNA *TTF1* (таблица).

Характеристики связывания miRNA с mRNA генов, связанных с развитием LCC

Ген	Характеристики связывания miRNA
<i>ASCL1</i>	miR-1281, 328 ⁵ , 91; miR-5739, 138 ⁵ , 92; miR-6817-3p, 1933 ^C , 92; miR-6878-3p, 4490 ³ , 91; miR-4317, 3821 ^C , 90; miR-23a-3p, 3820 ^C , 90; miR-4271, 153 ⁵ , 90; miR-1279, 7196 ³ , 90; miR-3652, 1173 ^C , 90.
<i>ACTA2</i>	miR-6834-3p, 608 ^C , 92.
<i>CDH1</i>	miR-7160-3p, 185 ^C , 91; miR-1273g-3p, 3269 ³ , 90; miR-1273h-5p, 3303 ³ , 91
<i>CEACAM5</i>	miR-1285-5p, 3476 ³ , 93.
<i>CHGA</i>	miR-6779-5p, 704 ^C , 90; miR-4487, 808 ^C , 90; miR-6886-3p, 1337 ^C , 93; miR-4290, 1510 ^C , 90.
<i>HTRA1</i>	miR-4792, 253 ^C , 90.
<i>SEMA3B</i>	miR-2861, 2276 ^C , 96.
<i>TTF1</i>	miR-619-5p, 2732 ^C , 91.

Примечание. Во втором столбце последовательно указаны: miRNA, позиция сайта связывания miRNA в mRNA (нт), величина $\Delta G/\Delta G_m$ (%); ⁵, ^C и ³ - сайты локализованы в 5'UTR, CDS и 3'UTR, соответственно.

Девять miRNA связываются в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA гена *ASCL1* с высокой эффективностью ($\Delta G/\Delta G_m \geq 90\%$). Сайты связывания трех miRNA выявлены для mRNA генов *CDH1* и *CHGA*. miR-1273g-3p и miR-1273h-5p имеют участки связывания в 3'UTR mRNA гена *CDH1*. Специфичность экспрессии гена *CDH1* наряду с генами *ACTA1*, *ACTA2*, *AL1A1*, *AK1C1*, *AK1C3*, *AVP*, *BRS3*, *CALCA*, *CEACAM5*, *HTRA2* и *CD44* показана для LCC субтипа [8, 9].

Известно, что классическими иммуногистохимическими маркерами LCC являются гены *TF1*, *p63*, *CK5*, *CK7*, дополнительными маркерами - гены *NAPSA*, *Apn63* и *DSC3* [10]. Повышенная экспрессия в опухолевых клетках была ранее показана для генов *TF1*, *CEACAM5*, *NAPSA*, *CK18*, *FOSL1*, *S100A2*, *NSPC*, пониженная экспрессия для гена *CSTA* [11-14]. miR-1285-5p и miR-619-5p имеют сайты связывания с mRNA генов маркеров *CEACAM5*, *TF1*. То есть, экспрессия выявленных нами генов-мишеней miRNA изменяется при немелкоклеточном раке легкого.

Ранее нами были изучены свойства miRNA семейства miR-1273, а также miR-1285-5p, miR-619-5p [15-17]. Эти miRNA имеют несколько сотен генов-мишней, что позволило назвать их уникальными miRNA (umiRNA). Также показано, что экспрессия ряда генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, находится под сильным контролем уникальных miRNA. Множественное число сайтов связывания miRNA свидетельствует о повышенной связи между соответствующими miRNA и генами [15-17].

При изучении специфичности связей miRNA с mRNA генов, экспрессия которых изменяется при мелкоклеточном раке легкого (SCLC) [18], нами показано, что уникальные miRNA miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-3960, miR-619-5p, miR-574-5p связываются с mRNA нескольких генов, экспрессия которых меняется при SCLC. mRNA некоторых из этих генов имеют от двух до восьми упорядочено расположенных сайтов связывания с уникальными miRNA.

Таким образом уникальные miRNA могут служить биомаркерами таких субтипов рака легкого, как SCLC и LCC. Полученные данные будут способствовать разработке методов ранней диагностики LCC и улучшению лечения этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Travis W., Brambilla E., Mueller-Hermelink H., Harris C. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics: tumors of the lung, pleura, thymus and heart. – World health organization. – Geneva, 2004.
- [2] Общие вопросы диагностики и лечения в онкологии. Материалы Съезда онкологов и радиологов Казахстана. – Алматы, 2014. – 143 с.
- [3] Guz M., Rivero-Muller A., Okon E., et al. MicroRNAs-role in lung cancer // Disease Markers. – 2014. – Vol. 2014. – P. 218169.
- [4] Gao Y., Gao F., Ma J.L., et al. The potential clinical applications and prospects of microRNAs in lung cancer // Journal of Onco Targets and Therapy. – 2014. – Vol. 7. – P. 901-906.
- [5] Li Q., Li X., Guo Zh., et al. MicroRNA-574-5p was pivotal for TLR9 signaling enhanced tumour progression via down-regulating checkpoint suppressor 1 in human lung cancer // Plos One. – 2012. – Vol. 7. – e48278.
- [6] Waters P.S., Dwyer R.M., Brougham C., et al. Impact of tumor epithelial subtype on circulating microRNAs in breast cancer patients // Plos One. – 2014. – Vol. 9(3). – e90605.
- [7] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. miR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinfromation. – 2014. – Vol. 10(7). – P. 423-427.
- [8] Nomura M., Fukuda T., Fujii K., et al. Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung // An FFPE J Clin proteomic study. Bioinforma. – 2011. – Vol. 1(1). – P. 23.
- [9] Sakai Y., Yamasaki T., Kusakabe Y., et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of lung with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation and co-expression of adenocarcinoma markers: a case report and review of the literature // Multidiscip Respir Med. – 2013. – Vol. 8(1). – P. 47.
- [10] Barbareschi M., Cantaloni C., Del Vescovo V., et al. Heterogeneity of large cell carcinoma of the lung: an immunophenotypic and miRNA-based analysis // Am J Clin Pathol. – 2011. – Vol. 136(5). – P. 773-782.
- [11] Nitadori J., Ishii G., Tsuta K., et al. Immunohistochemical differential diagnosis between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma by tissue microarray analysis with a large antibody panel // Am J Clin Pathol. – 2006. – Vol. 125(5). – P. 682-692.
- [12] Hellman G.M., Fields W.R., Doolittle D.J. Gene expression profiling of cultured human bronchial epithelial and lung carcinoma cells // Toxicological sciences. – 2012. – Vol. 61(1). – P. 154-163.
- [13] Watanabe T., Miura T., Degawa Y., et al. Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR // Cancer Cell Int. – 2010. – Vol. 10. – P. 2.
- [14] Ge M., Wang M., Wu Q., et al. Gene expression signature for lymphatic metastasis of human lung adenocarcinoma // Chinese Journal of Cancer. – 2009. – Vol. 28(3). – P. 220-224.
- [15] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., et al. 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. 1-8.

- [16] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes // Biomed Research International. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-11.
- [17] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. Binding sites of the miR-1273 family, miR-1285-3p and miR-5684 in human mRNAs // Proceedings of the Inter. Conf. on Biology and Biomedical Engineering. – Venice, Italy, March, 2014. – P. 102-108.
- [18] Ниязова Р.Е., Берилло О.А., Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т. Свойства miRNA, специфичных для генов, участвующих в развитии мелкоклеточного рака легкого // Известия НАН РК. – 2014. – № 5.

REFERENCES

- [1] Travis W., Brambilla E., Mueller-Hermelink H., Harris C. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics: tumors of the lung, pleura, thymus and heart. World health organization. Geneva, 2004.
- [2] Obshhie voprosy diagnostiki i lechenija v onkologii. Materialy S'ezda onkologov i radiologov Kazahstana. Almaty, 2014. 143 s.
- [3] Guz M., Rivero-Muller A., Okon E., et al. MicroRNAs-role in lung cancer. Disease Markers. 2014. Vol. 2014. P. 218169.
- [4] Gao Y., Gao F., Ma J.L., et al. The potential clinical applications and prospects of microRNAs in lung cancer. Journal of Onco Targets and Therapy. 2014. Vol. 7. P. 901-906.
- [5] Li Q., Li X., Guo Zh., et al. MicroRNA-574-5p was pivotal for TLR9 signaling enhanced tumour progression via down-regulating checkpoint suppressor 1 in human lung cancer. Plos One. 2012. Vol. 7. e48278.
- [6] Waters P.S., Dwyer R.M., Brougham C., et al. Impact of tumor epithelial subtype on circulating microRNAs in breast cancer patients. Plos One. 2014. Vol. 9(3). e90605.
- [7] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. miR-3960 binding sites with mRNA of human genes. Bioinformation. 2014. Vol. 10(7). P. 423-427.
- [8] Nomura M., Fukuda T., Fujii K., et al. Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. An FFPE J Clin proteomic study. Bioinforma. 2011. Vol. 1(1). P. 23.
- [9] Sakai Y., Yamasaki T., Kusakabe Y., et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of lung with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation and co-expression of adenocarcinoma markers: a case report and review of the literature. Multidiscip Respir Med. 2013. Vol. 8(1). P. 47.
- [10] Barbareschi M., Cantaloni C., Del Vescovo V., et al. Heterogeneity of large cell carcinoma of the lung: an immunophenotypic and miRNA-based analysis. Am J Clin Pathol. 2011. Vol. 136(5). P. 773-782.
- [11] Nitadori J., Ishii G., Tsuta K., et al. Immunohistochemical differential diagnosis between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma by tissue microarray analysis with a large antibody panel. Am J Clin Pathol. 2006. Vol. 125(5). P. 682-992.
- [12] Hellman G.M., Fields W.R., Doolittle D.J. Gene expression profiling of cultured human bronchial epithelial and lung carcinoma cells. Toxicological sciences. 2012. Vol. 61(1). P. 154-163.
- [13] Watanabe T., Miura T., Degawa Y., et al. Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR. Cancer Cell Int. 2010. Vol. 10. P. 2.
- [14] Ge M., Wang M., Wu Q., et al. Gene expression signature for lymphatic metastasis of human lung adenocarcinoma. Chinese Journal of Cancer. 2009. Vol. 28(3). P. 220-224.
- [15] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., et al. 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. 1-8.
- [16] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes. Biomed Research International. 2014. Vol. 2014. P. 1-11.
- [17] Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. Binding sites of the miR-1273 family, miR-1285-3r and miR-5684 in human mRNAs. Proceedings of the Inter. Conf. on Biology and Biomedical Engineering. Venice, Italy, March, 2014. P. 102-108.
- [18] Ниязова Р.Е., Берилло О.А., Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т. Свойства miRNA, специфичных для генов, участвующих в развитии мелкоклеточного рака легкого. Известия НАН РК. 2014. № 5.

ӨКПЕНИҢ ІРІЖАСУШАЛЫҚ КАРЦИНОМА КЕЗІНДЕГІ miRNA мен mRNA БАЙЛАНЫСТАРЫНЫң ТАЛҒАМДЫЛЫФЫ

Р. Е. Ниязова, О. А. Берилло, Ш. А. Атамбаева, А. Т. Иващенко

Ұлттық нанотехнологиялық зертхана, аль-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университет, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: ген, miRNA, mRNA, немелкоклеточный рак легкого, өкпесінің іріжасушалық карцинома.

Аннотация. Адам өкпесінің іріжасушалық карциноманың дамуына жауапты гендердің mRNA-мен miRNAның байланысызы зерттелген. ASCL1, ACTA2, CDH1, CEACAM5, CHGA, HTRA1, SEMA3B, TTF1 гендердің mRNA-мен miRNAның байланысатын сайттары 5'UTR, CDS және 3'UTR орналасқан, $\Delta G/\Delta G_m$ 90%-ке тең немесе жоғары. Өкпенің іріжасушалық обиры кезінде экспрессиясы өзгеретін гендердің mRNA-мен miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-5p және miR-619-5p байланысатын сайттары анықталған. miRNAның онкогенезге катысады гендердің экспрессиясына әсері бойынша алынған мәліметтер өкпенің іріжасушалық карциноманың ерте диагностикасын жүргізуге мүмкіндік бере алады.

Поступила 10.11.2014 г.