

О. А. БЕРИЛЛО, А. Т. ИВАЩЕНКО

(Национальная нанотехнологическая лаборатория,
Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы)

РЕГУЛЯЦИЯ ИНТРОННЫМИ MicroRNA ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ РАКА ПИЩЕВОДА И ЖЕЛУДКА

Аннотация

Предсказаны сайты связывания интронных miRNA¹ с mRNA генов, которые являются ключевыми участ-никами рака пищевода и желудка. Выявлены сайты связывания с высокой энергией гибридизации, которые расположены в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA.

Найдено шесть miRNA сайтов связывания с полной комплементарностью. По результатам полученных данных, построены генные сети взаимодействий между хозяйскими генами и генами-мишенями посредством интронных miRNA. Результаты исследования являются полезными для разработки методов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, рак пищевода, рак желудка.

Кілт сөздер: miRNA, mRNA, өңештің обыры, асқазанның обыры.

Keywords: miRNA, mRNA, cancer of gullet, cancer of stomach.

По данным Республики Казахстан за 2011 год количество больных раком составило 30 299 че-ловек [1]. Среди этого числа людей, 8,8% составляют больные раком желудка и 4,4% – раком пищевода. Смертность больных раком людей начинает снижаться благодаря диагностике заболе-ваний на ранних стадиях [1]. В настоящее время во всем мире разрабатываются молекулярные не инвазивные методы ранней диагностики рака пищевода и желудка на основе анализа в крови изменений концентрации метаболитов [2], белков [3], ДНК [4], miRNA [5-14] и т.д.

MicroRNA (miRNA) являются представителями класса коротких белок-некодирующих RNA со средней длиной 22 нуклеотида. Они связываются почти комплементарно с mRNA и подавляют ее трансляцию [15]. MiRNA по происхождению делятся на 2 класса:

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

инtragenные, кодируемые в интронах, экзонах и нетранслируемых регионах (3'UTR, 5'UTR), и межгенные [16]. Большинство интронных miRNA транскрибируются совместно с их хозяйскими генами, но некоторые имеют независимые промоторы [17].

MiRNA функционируют в биологических жидкостях человека и являются стабильными молекулами [5]. Нарушения в регуляции взаимодействий между miRNA и mRNA может приводить к развитию аутоиммунных, кожных, психических, нейродегенеративных [18] и онкологических [19] заболеваний. MiRNA можно использовать как потенциальные неинвазивные биомаркеры для выявления специфической экспрессии генов при онкологических заболеваниях [20]. MiRNA обладают разным профилем экспрессии в крови больных раком пищевода [21] и желудка [5], по сравнению со здоровыми людьми.

За последние годы выявлено большое число miRNA и требуется их изучение. Предсказание новых сайтов связывания miRNA и поиск их в mRNA онкогенов с высокой достоверностью необходимы для при разработке методов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности 2042 pre-miRNA получены из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org/>), из них выявлено 915 интронных miRNA. В результате анализа литера-турных данных отобраны гены, участвующие в развитии рака пищевода и желудка. Нуклеотидные последовательности предшественников mRNA этих генов человека получены из Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием программы Lextractor скрипт. По программе RNAHybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) определяли начало сайтов связывания, свободную энергию гибридизации (ΔG) и схемы их взаимодействия. E-RNAhybrid скрипт использовали для расчета отношения $\Delta G/\Delta G_m$, коэффициента Стьюдента, уровня достоверности (p) и определение области mRNA, где расположен сайт (5'UTR, CDS, или 3'UTR).

Рассчитывали отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где параметр ΔG_m равен свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Уровень достоверности (p) определялся на основе значений ΔG и их стандартного отклонения. Генные сети построены с помощью скрипта Net_builder. Скрипты E-RNAhybrid, Lextractor и Net_builder (<http://sites.google.com/site/malaheenee/software>) написаны в нашей лаборатории.

Приложение с таблицами 1, 2 и рисунками 1, 2 размещены на сайте <https://sites.google.com/site/malaheenee/articles>.

Результаты и обсуждение

В результате анализа литературных данных выявлено 383 гена, участвующих в развитии рака пищевода, и 71 ген участвующий в развитии рака желудка. Сайты связывания

miRNA отобраны при отношении $\Delta G/\Delta G_m$ равном более 80% (Приложение, таблицы 1, 2).

Установлено, что 20% изученных генов не имеют сайтов связывания с miRNA. По результатам полученных данных построены генные сети между хозяйскими генами и генами-мишенями, связь между которыми образуют интронные miRNA (Приложение, рисунок 1, 2).

Интронные microRNA являются регуляторами экспрессии генов, участвующих в развитии рака пищевода. 249 интронных miRNA имеют 944 сайта связывания с 310 mRNA генов-мишеней, белки которых участвуют канцерогенезе пищевода. Многие из этих miRNA имеют сайты связывания в нескольких mRNA (Приложение, таблица 1). Например, ген LSAMP кодирует miR-4447, которая имеет сайты связывания в 69 генах-мишенях с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 80%. Большинство предсказанных miRNA сайтов связывания (488) расположены в CDS. В 3'UTR локализовано 310 сайтов и в 5'UTR выявлено 182 сайта.

249 интронные miRNA кодируются 242 хозяйскими генами. Некоторые хозяйские гены кодируют по несколько miRNA. Например, в интроне гена PFKM расположена pre-miR-6505, из которой вырезаются зрелые miR-6505-5p и miR-6505-3p. Выявлены предшественники miRNA расположенные в интронах нескольких генов. Например, miR-548f кодируется в mRNA генов PCDH15, ERBB4, TMEM232, CNTNAP2 и DMD.

На рисунке 1 (Приложение) представлена схема взаимодействий между mRNA хозяйских генов и генов-мишеней, где связь образуют интронные miRNA. Характеристики этих сайтов связывания miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90% представлены в таблице 1. mRNA генов-мишеней имеют от одного до трех сайтов связывания.

Таблица 1 – Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака пищевода

mRNA, начало сайта связывания (н.), miRNA (хозяйский ген)
AGRN 3950, miR-4447 (LSAMP); AKAP17A 2083, miR-4447 (LSAMP); CDK4 166, miR-4483 (C10orf81, PLEKHS1); CERS2 349, miR-4447 (LSAMP); CTSB 2415, miR-1273g-3p (SCP2); DENR 1292, miR-566 (SEMA3F); DSC3 4918, miR-1273g-3p (SCP2); 5019, miR-1268b (CCDC40), FAM210B 1734, miR-5095 (SCP2); 1785, miR-4452 (MAPK10); FUS 2848, miR-1273g-3p (SCP2); GMFB 14, miR-4685-3p (HPS1); GNAS 986, miR-4447 (LSAMP); HLA-E 1622, miR-5585-3p (TMEM39B); IGFBP3 2211, miR-4264 (CTNNA2); KCMF1 6262, miR-5096 (BMP2K); KRT16 1591, miR-4316 (SEPT9); KTN1 169, miR-1273g-3p (SCP2); LAPTM5 2157, miR-4317 (L3MBTL4); MAK 2852, miR-1273g-3p (SCP2); MAZ 106, miR-4466 (ARID1B); MBD2 479, miR-4312 (ANP32A); MGA 9389, miR-4755-5p (RALY); NDUFC2 2058, miR-1273g-3p (SCP2); NOL10 3221, miR-5009-3p (AP3S2, C15orf38); NTRK2 2056, miR-4481 (CAMK1D); NUMBL 3082, miR-4452 (MAPK10); PAFAH1B1 226, miR-4281 (SNCB); PDLIM5 1193, miR-4531 (PVR); 2584, miR-5095

(SCP2); 3276, miR-5096 (BMP2K); PECAM1 2125, miR-1273g-3p (SCP2); PHKG2 2445, 2929, miR-1273g-3p (SCP2); PLD3 2111, miR-4266 (SH3RF3); PSMF1 63, miR-4297 (EBF3); RPL15 1966, miR-553 (RTCD1); RPS24 1795, miR-1273g-3p (SCP2); SF1 1961, miR-4447 (LSAMP); SHC1 568, miR-1910 (C16orf74); SLC1A2 106, miR-4447 (LSAMP); SLC2A3 3460, miR-5095 (SCP2); SPPL3 2297, miR-1277-5p (WDR44); 3829, miR-5096 (BMP2K); SPTAN1 7011, miR-4486 (NAV2); TAP1 1742, miR-151b (EVL); TAPBP (2509, 2814, miR-1273g-3p (SCP2); TLN1 8255, miR-4481 (CAMK1D); TPM3 6563, miR-1273g-3p (SCP2); TUBB 1598, miR-1271-3p (ARL10); UBA52 1114, miR-1273a (RGS22); 1138, miR-1273g-3p (SCP2); UQCRB 1341, miR-5096 (BMP2K); VPS18 1918, miR-4447 (LSAMP); ZNF462 5926, miR-4447 (LSAMP).

Большинство mRNA хозяйских генов имеют связь с одной mRNA гена-мишени, за исключением некоторых. Например, SCP2 ген кодирует miR-1273g-3p, miR-1273g-5p и miR-5095. MiRNA этого хозяйского гена образуют связь через регуляцию трансляции с 15 mRNA генов-мишеней (NDUFC2, KTN1, RPS24, TPM3, PDLIM5, DSC3, CTSB, FUS, MAK, PECAM1, PHKG2, TAPBP, UBA52, FAM210B и SLC2A3). MiR-4447 образует сайты связывания с 8 mRNA генов-мишеней при отношении $\Delta G/\Delta G_m$ равном более 90%. Эта генная сеть демонстрирует связь между генами, которые не участвуют в одном метаболическом пути.

Выявлены mRNA генов AKAP17A, FAM210B, KRT16, SPPL3, UQCRB и IRF1, которые имеют полностью комплементарные сайты связывания с miRNA. Схемы этих взаимодействий представлены в таблице 2. Последние три mRNA имеют сайты связывания с miR-5096, которые являются идентичными у mRNA генов, белки которых выполняют разную функцию в клетке. Большинство сайтов связывания mRNA расположены в 3'UTR, за исключением AKAP17A (CDS). Первые пять генов являются важными участниками развития рака пищевода.

Таблица 2 – Схемы полностью комплементарных взаимодействий между miRNA и mRNA онкогенов

2083 н., CDS, -36.4 ккал/моль	1785 н., 3'UTR, -41.7 ккал/моль
AKAP17A mRNA 5'- GGAUGACAGCCCCCGCC -3'	FAM210B mRNA 5'- GUCACUUGAGGCCAGGAGUUCGA -3'
miR-4447 3'-UUUGUUGUCGGGGGUGG- 5'	miR-4452 3'- UAGUGAAUUCGGUUCUUAAGUU -5'
1591н., 3'UTR, -40.7 ккал/моль	3829 н., 3'UTR, -43.7 ккал/моль
KRT16 mRNA 5'- CACCAGCUGGCCUCACC -3'	SPPL3 mRNA 5'- GCCUGGCCAACAUGGUGAAAC -3'

miR-4316 3'- GUGGUCGAUCGGAGUGG -5'	miR-5096 3'- CGGACUGGUUGUACCACUUUG -5'
1341н., 3'UTR, -43.7 ккал/моль	*2594 н.,3'UTR, -43.7 ккал/моль
UQCRB mRNA 5'- GCCUGGCCAACAUUGGUGAAAC -3' miR-5096 3'- CGGACUGGUUGUACCACUUUG -5'	IRF1 mRNA 5'- GCCUGGCCAACAUUGGUGAAAC -3' miR-5096 3'- CGGACUGGUUGUACCACUUUG -5'
Примечание: * miR-5096 сайт связывания относится к mRNA гена IRF1, участвующего в развитии рака желудка.	

Интронные miRNA являются регуляторами экспрессии генов, участвующих в развитии рака желудка. Предсказано 306 сайтов связывания miRNA, которые образуются между 177 miRNA и 57 генами, участвующими в развитии рака желудка (Приложение, таблица 2). Среди них, 126 сайтов связывания miRNA расположены в CDS, 124 – в 3'UTR и 56 – в 5'UTR.

Некоторые mRNA могут иметь по несколько сайтов связывания, например, mRNA гена PKD1 может связываться с восемью разными miRNA: miR-4258 (CKS1B), miR-4429 (GREB1), miR-4266 (SH3RF3), miR-5095 (SCP2), miR-5194 (FAM49B), miR-6071 (ATOH8), miR-4304 (PITPNM2), miR-3182 (CDH13), miR-4310 (SPTBN5), miR-4296 (CTBP2), где в скобках указаны хозяйские гены. Выявлены хозяйские гены, miRNA которых имеют сайты связывания в mRNA нескольких генов. Например, ген LSAMP кодирует miR-4447, которая имеет сайты связывания в mRNA генов CASP10, CD44, CDX1, EGFR, EGFR, EWSR1, IL1RN, MGAT4B, MUTYH, SOX9, и TP53.

В результате исследований выявлено 10 mRNA генов-мишеней, имеющих сайты связывания с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. Характеристики этих сайтов связывания представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов, участвующих при развитии рака желудка

mRNA, начало сайта связывания (н.), miRNA (хозяйский ген)
CASP10 3289, miR-4452 (MAPK10); CDH1 3269, miR-1273g-3p (SCP2); 417 miR-4266 (SH3RF3); 751 miR-4447 (LSAMP); EGFR 18, miR-4447 (LSAMP); 114 miR-4483 (C10orf81, PLEKHS1); ERBB2 24, miR-6090 (ETS1); 188 miR-4535 (FAM19A5); ID4 33, miR-4286 (RP1L1); IGF2 4307, miR-4296 (CTBP2); IRF1 2594, miR-5096 (BMP2K); 2797 miR-5585-3p (TMEM39B); PRKCA 6772, miR-1273g-3p (SCP2);

SOX9 1408, miR-4447 (LSAMP); ST8SIA4 3916, miR-566 (SEMA3F); STAT3 3264, miR-5585-3p (TMEM39B).

На рисунке 2 (Приложение) представлена схема взаимодействий между mRNA этих хозяйских генов и генов-мишеней через интронные miRNA. mRNA гена CDH1 имеет сайты связывания с miR-1273g-3p, miR-4266 и miR-4447 при уровне достоверности равным $p < 0,0001$. Экспрессия гена CDH1 может зависеть от экспрессии хозяйских генов SCP2, SH3RF3 и LSAMP через регуляцию интронными miRNA. Выявлено три гена (PKD1, KRAS, и COL3A1), которые участвуют в развитии рака пищевода и желудка. Многие miRNA имеют сайты связывания с mRNA генов участвующих в развитии обоих видов рака. miR-637, miR-613, miR-211-5p, miR-548aq-5p, miR-548at-5p, miR-1273c, miR-3657, miR-3972, miR-4260, miR-4715-5p, miR-4767, miR-5008-3p, miR-5579-5p, miR-6124, и miR-6165) имеют сайты связывания в mRNA генов, участвующих при развитии рака желудка.

Заключение. Предсказаны сайты связывания интронных miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA генов, участвующих в развитии рака пищевода и желудка. Эти сайты связывания имеют высокую степень гибридизации miRNA с mRNA и величины отношения $\Delta G/\Delta G_m$ равны более 80%. В результате анализа полученных данных показана важность хозяйских генов, кодирующих интронные miRNA. Нарушение экспрессии хозяйского гена может привести к изменению концентрации его интронной miRNA и оказать влияние на трансляцию мРНК гена-мишени. Выявлено шесть сайтов связывания с полной комплементарностью miRNA с mRNA. Высокая стабильность miRNA в биологических жидкостях организма и высокая степень комплементарности сайтов связывания miRNA с mRNA способствуют использованию miRNA в разработке ранних методов диагностики рака пищевода и желудка.

Литература

http://news.headline.kz/chto_v_strane/ejegodno_ot_raka_v_kazahstane_umiraet_17_tyisyach_ch_elovek.html

Liu R., Peng Y., Li X., Wang Y., Pan E., Guo W., et al. Identification of plasma metabolomic profiling for diagnosis of esophageal squamous-cell carcinoma using an UPLC/TOF/MS platform // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 8899-8911.

Fan N.J., Gao C.F., Zhao G., Wang X.L., and Qiao L. Serum peptidome patterns for early screening of esophageal squamous cell carcinoma // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2012. – Vol. 59. – P. 276-282.

Ghorbian S., Ardekani A.M. Non-Invasive Detection of Esophageal Cancer using Genetic Changes in Circulating Cell-Free DNA // *Avicenna J. Med. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 4. – P. 3-

Rotkrua P., Shimada S., Mogushi K., Akiyama Y., Tanaka H., and Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model // *Br. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 108. – P. 932-940.

Cai H., Yuan Y., Hao Y.F., Guo T.K., Wei X., and Zhang Y.M. Plasma microRNAs serve as novel potential biomarkers for early detection of gastric cancer // *Med Oncol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 452.

Gorur A., Balci F.S., Dogruer U.N., Ayaz L., Akbayir S., Yildirim Y.H., et al. Determination of plasma microRNA for early detection of gastric cancer // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. – Vol. 40. – P. 2091-2096.

Song M.Y., Pan K.F., Su H.J., Zhang L., Ma J.L., Li J.Y., et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e33608.

Takeshita N., Hoshino I., Mori M., Akutsu Y., Hanari N., Yoneyama Y., et al. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma // *Br. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 108. – P. 644-652.

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. – P. 169-176.

Yokobori T., Suzuki S., Tanaka N., Inose T., Sohda M., Sano A., et al. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1 // *Cancer Sci.* – 2013. – Vol. 104. – P. 48-54.

Gu J., Wang Y., and Wu X. MicroRNA in the pathogenesis and prognosis of esophageal cancer // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19. – P. 1292-1300.

Blanco-Calvo M., Calvo L., Figueroa A., Haz-Conde M., Antón-Aparicio L., Valladares-Ayerbes M. Circulating microRNAs: molecular microsensors in gastrointestinal cancer // *Sensors (Basel).* – 2012. – Vol. 12. – P. 9349-9362.

Liu R., Liao J., Yang M., Shi Y., Peng Y., Wang Y., et al. Circulating miR-155 expression in plasma: a potential biomarker for early diagnosis of esophageal cancer in humans // *J. Toxicol. Environ. Health A.* – 2012. – Vol. 75. – P. 1154-1162.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., and Tuschl T. Identification of novel genes CDS for small expressed RNAs // *Science* – 2001. – Vol. 294. – P. 853-858.

Hinske L.C., Heyn J., Galante P.A., Ohno-Machado L., and Kreth S. Setting up an intronic miRNA database // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 936. – P. 69-76.

He C., Li Z., Chen P., Huang H., Hurst LD., and Chen J. Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: implications of miRNA-host gene coevolution // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – P. 4002-4012.

Ha T.Y. MicroRNAs in human diseases: from autoimmune diseases to skin., psychiatric and neurodegenerative disease // Immune. Netw. – 2011. – Vol. 11. – P. 227-244.

Farazi T.A., Hoell J.I., Morozov P., Tuschl T. MicroRNAs in human cancer // Adv. Exp. Med. Biol. – 2013. – Vol. 774. – P. 1-20.

Sanfiorenzo C., Ilie M.I., Belaid A., Barlési F., Mouroux J., Marquette C.H., et al. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – P. e54596.

Liu R., Liao J., Yang M., Shi Y., Peng Y., Wang Y., et al. Circulating miR-155 expression in plasma: a potential biomarker for early diagnosis of esophageal cancer in humans // J. Toxicol. Environ. Health. A // 2012. – Vol. 75. – P. 1154-1162.

Резюме

О. А. БЕРИЛЛО, А. Т. ИВАЩЕНКО

(Ашық түрдегі ұлттық нанотехнологиялық зертхана,
аль-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы)

ӨНЕШ ЖӘНЕ АСҚАЗАН ІСІГІНІҢ ДАМУЫНА ҚАТЫСАТЫН ГЕНДЕРДІҢ ЭКСПРЕССИЯСЫН ИНТРОНДЫҚ MICRORNA АРҚЫЛЫ РЕТТЕУ

Өнеш және асқазан ісігінің дамуының негізгі қатысушы болып табылатын гендер mRNA-ларының интрондық miRNA-лармен байланыс сайттары табылған. mRNA-ның 5'UTR, CDS және 3'UTR-де орналасқан будандастыру энергиясы жоғары байланыс сайттар анықталған. Толық комплементарлық алты байланысатын сайттары табылған. Анықталған нәтижелер бойынша интрондық miRNA арқылы иелік гендермен нысана гендердің қарым-қатынас жүйесі құрастырылған. Зерттеу нәтижелері онкологиялық аурулардың ерте диагностика тәсілдерін дамытуға пайдалы болып табылады.

Кілт сөздер: miRNA, mRNA, өнештің обыры, асқазанның обыры.

Summary

O.A. BERILLO, A.T. IVASHCHENKO

(National nanotechnology laboratory,
al-Farabi Kazakh National University, Almaty)

BINDINGS OF INTRONIC MicroRNAs WITH mRNAs OF GENES PARTICIPATING
IN DEVELOPMENT OF SMALL BOWEL AND COLORECTAL CANCER

Bindings of 915 human intronic miRNAs with mRNAs of 90 genes participating in development small bowel and coloractal cancer were studied. 116 binding sites with 74 intronic miRNAs which can inhibit the mRNA translation of 36 genes participating in development small bowel and coloractal cancer were established. 52 intronic miRNAs forming 99 binding sites with 38 mRNA of genes participating in development coloractal cancer were revealed. The found sites of miRNA binding with mRNA were localized in 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNA regions. The obtained data about influence of intronic miRNA on mRNA expression of the genes participating in a carcinogenesis promote development of diagnostics methods of cancer of small bowel and coloractal cancer on early stage.

Keywords: miRNA, mRNA, cancer of gullet, cancer of stomach.

Поступила 13.05.2013 г.