На правах рукописи



Цыренжапова Сэсэг Витальевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ МИКРОРНК ПРИ МЕЛАНОМЕ И МЕЛАНОЦИТАРНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ КОЖИ

1.5.22. – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор **Рукша Татьяна Геннадьевна**

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, руководитель
лаборатории физиологии протективной системы
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии» — филиал
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения Российской академии наук **Повещенко Александр Федорович**

доктор медицинских наук, профессор,
заместитель главного врача по научной работе
ГБУЗ Новосибирской области «Новосибирский
областной онкологический диспансер»;
заведующий кафедрой онкологии ГБОУ ВПО
«Новосибирский государственный
медицинский университет» Минздрава России **Войцицкий Владимир Евгеньевич**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2021 г. в _10_ час. на заседании Диссертационного Совета 24.1.242.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора (кандидата) наук при ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Тел./факс 8 (383) 333-64-56 https://frcftm.ru/fits-ftm/dissertatsionnye-sovety/dissertatsionnyj-sovet-d-001-048-01

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2021 г.
Учёный секретарь
диссертационного совета

доктор биологических наук **Пальчикова Н. А.**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Меланома кожи является опухолью, характеризующейся высокой степенью гетерогенности и быстрым развитием метастазирования. Заболеваемость меланомой кожи увеличивается не только в Российской Федерации, но и в других странах мира у лиц со светлым типом кожи (Каприн А.Д. и др., 2017; Wernli K.J. et al, 2016, Davis L.E. et al., 2019;). И хотя международные клинические исследования, проводимые на протяжении последних лет, выявили эффективные иммунотерапевтические подходы для лечения поздних стадий меланомы (Ascierto P.A., Marincola F.M., 2014; Stark M.S. et al., 2015), тем не менее, 5-летняя выживаемость у пациентов с диссеминированной меланомой составляет лишь 5-19% (Sandru A. et al., 2014).

Не только генетические, но и эпигенетические изменения вносят вклад в развитие онкологических заболеваний, опухолевую трансформацию клеток. МикроРНК - это класс малых некодирующих молекул РНК, действующих эпигенетически, в основном состоящих из 22 нуклеотидов, и играющих ключевую роль в посттранскрипционной регуляции генов (Zhang Y. et al., 2015; Mumford S.L. et al., 2018;). Одним из механизмов действия микроРНК является их связывание с комплементарными участками в 3′-нетранслируемой области мРНК, что индуцирует ее деградацию и снижает экспрессию (Romano G., Kwong L.N., 2017).

МикроРНК играют значительную роль в регуляции экспрессии большинства генов, оказывая влияние на различные биологические процессы, как в нормальных физиологических условиях, так и при патологических процессах и заболеваниях (Fogli S. et al., 2017). В последнее время накоплено достаточное количество новых сведений, указывающих на участие нарушений регуляции со стороны микроРНК в патогенезе злокачественных новообразований человека. Изменение экспрессии различных микроРНК было обнаружено при всех злокачественных опухолях, включая рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких, первичную глиобластому, папиллярный рак щитовидной железы и опухоли поджелудочной железы (Li Y., Kowdley K.V., 2012). Исходя из имеющихся сведений, можно предполагать, что в регуляции опухолевого роста микроРНК могут играть роль онкогенов либо опухолевых супрессоров.

Степень разработанности темы исследования. На сегодняшний день известно несколько тысяч различных микроРНК, каждая из которых может регулировать несколько процессов в клетке, таких как клеточная миграция, дифференциация, пролиферация и запрограммированная клеточная гибель (Bartel D.P., 2004; Zhi F. et al., 2013). Исследования последних лет показали, что существует уникальный профиль экспрессии микроРНК в различных типах опухолей, а также на разных стадиях ее развития (Thyagarajan A. et al., 2019).

Экспрессионный профиль микроРНК характеризуется высокой тканеспецифичностью. Также известно, что микроРНК обладают высокой стабильностью в биологических образцах (Naidu S. et al., 2015; Thompson J.R. et al., 2017). Следовательно, эти молекулы являются перспективными мишенями для диагностики и таргетной терапии злокачественных новообразований.

Цель работы - оценить особенности экспрессионного профиля микроРНК при меланоме и доброкачественных меланоцитарных новообразованиях кожи; определить роль микроРНК в регуляции функциональных свойств клеток меланомы.

Задачи исследования

1. Оценить профиль экспрессии микроРНК при меланоме и доброкачественных меланоцитарных новообразованиях кожи на основе микрочипирования;
2. Провести биоинформатический анализ с целью выявления сигнальных путей и генов-мишеней для микроРНК, уровни которых разнятся при меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами;

3. Определить гены-мишени и сигнальные пути, регулируемые микроРНК miR-4286;
4. Исследовать влияние микроРНК miR-4286 на клеточный цикл и миграцию клеток меланомы.

Научная новизна. В представленной работе впервые выявлены микроРНК miR-4306, как повышено экспрессирующаяся в меланоме относительно меланоцитарных невусов и miR-6853-5p как снижено экспрессирующаяся в меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами. Впервые показано, что данные микроРНК принимают участие в регуляции внутриклеточных процессов таких как, биологическая адгезия, каталитическая активность, межклеточные взаимодействия согласно регулируемым ими сигнальным каскадам, таким как «Wnt-сигнальный путь», «Сигнальный путь кадгеринов» и «Сигнальный путь развития болезни Гентингтона». В целом, по результатам микрочипирования определено 446 микроРНК, уровни которых разнятся при меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами. Впервые выполнен биоинформатический анализ микроРНК miR-4286 и определено ее участие в регуляции процессов пролиферации, миграции, дифференцировки, выживаемости и гибели клеток, согласно регулируемым данной микроРНК генам-мишеням. Впервые на клеточной линии меланомы BRO проведено функциональное исследование влияния целенаправленного ингибирования микроРНК miR-4286 специфическим ингибитором anti-miR-4286 на функциональные свойства клеток меланомы. Впервые установлено, что ингибирование anti-miR-4286 микроРНК miR-4286 замедляет пролиферацию, повышая долю клеток меланомы, находящихся в фазах S и G2 клеточного цикла, а также замедляет их миграцию.

Теоретическая и практическая значимость

1. Изменение профиля микроРНК в клетках меланоцитарных новообразований в сторону повышения уровня микроРНК, регулирующих внутриклеточные каскады «Сигнальный путь развития меланомы», «Сигнальный путь развития глиомы», «Сигнальный путь развития рака поджелудочной железы» может свидетельствовать о злокачественном типе новообразования, в то время как повышение уровня микроРНК, участвующих в регуляции процессов «Процессинг и презентация антигена», «Процессинг белков в эндоплазматическом ретикулуме», «Взаимодействие цитокинов с рецептором цитокинов» является характерным для доброкачественных меланоцитартных новообразований, что может быть использовано при разработке способов дифференциальной диагностики меланомы кожи.

2. Воздействие на уровень микроРНК miR-4286 с целью регуляции миграции и пролиферации в клетках меланомы может использоваться при разработке новых комплексных терапевтических подходов в отношении данного новообразования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. По результатам профилирования выявлены 446 микроРНК, уровни экспрессии которых имеют различия более чем в 2 раза в меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами; уровень экспрессии микроРНК miR-4286 повышен в меланоме по сравнению с невусами в 27,6 раза, а miR-4306 в 16,2 раза, уровень экспрессии miR-6853-3p снижен в меланоме в 2,1 раза по сравнению с невусами.

2. Гены-мишени, регулируемые микроРНК, уровни которых повышены при меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами, являются компонентами внутриклеточных механизмов передачи сигнала «Биосинтез жирных кислот», «Метаболизм жирных кислот», «Сигнальный путь развития меланомы», «Сигнальный путь развития рака поджелудочной железы», «Сигнальный путь развития глиомы», в то время как гены-мишени микроРНК, уровни которых повышены при доброкачественных меланоцитарных новообразованиях, являются компонентами внутриклеточных механизмов передачи сигнала «Процессинг и презентация антигена», «Процессинг белков в эндоплазматическом ретикулуме», «Взаимодействие цитокинов с цитокиновым

рецептором».

3. Согласно биоинформатическому анализу, miR-4286 регулирует гены-компоненты механизмов внутриклеточной сигнализации «Биосинтез жирных кислот», «Сигнальный путь развития глиомы», «Биосинтеза N-гликанов». Гены-мишени miR-4286 участвуют в реализации процессов клеточной пролиферации, дифференцировки и гибели клеток (PIM1, RHEBL1, GLUL, EEF2K, PTPRF, FOX04, RNF157, GFRA1, RORB, DMTF1, MED1, PSMD11, SOX30, FAM96A). Кроме того, обнаружены гены, отвечающие за клеточную миграцию и адгезию (MINK1, LRRC4, TBC1D10C, PTPRF, PLXNA2). Снижение уровня miR-4286 после трансфекции в клетки меланомы специфического ингибитора данной микроРНК вызывает замедление миграции клеток на 11% и повышение доли клеток, находящихся в фазах S и G2 клеточного цикла на 16%, что свидетельствует об участии микроРНК miR-4286 в регуляции процессов миграции и пролиферации клеток меланомы.

Внедрение результатов исследования. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова КрасГМУ для студентов, обучающихся по специальностям 310501 – «Лечебное дело» и 310502 – «Педиатрия» по теме «Повреждение клетки».

Апробация работы. Материалы и результаты исследований доложены и обсуждены на XXI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 2015г. Результаты исследований также представлены на Международном интеллектуальном конкурсе студентов и аспирантов «University Stars – 2016», г. Москва, а также на XXXVIII Международной научно-практической конференции «Российская наука в современном мире», г. Москва.

Данная диссертационная работа поддержана грантом Российского научного фонда «Экспрессия и роль микроРНК при меланоме кожи» (проект № 14-15-00074-П), 2014г.

В рамках международной сетевой программы обмена студентами и аспирантами G-MedEx была осуществлена стажировка в исследовательской лаборатории кафедры дерматологии университета г. Ниигата, Япония, с целью получения необходимых теоретических и практических навыков овладения современными методами молекулярно-биологических исследований.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования статей, содержащих результаты диссертационных исследований.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опухолевый материал, заключенный в парафиновые блоки от больных меланомой кожи (n=7) и доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи (n=3) были получены из КГБУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро». Возраст пациентов с меланомой кожи составлял от 35 до 81 года. Среди них двое мужчин и пять женщин. Возраст пациентов с доброкачественными меланоцитарными невусами составлял от 29 до 55 лет, среди них были все женщины. Процентное содержание злокачественных клеток в образцах меланомы и здоровых меланоцитов в доброкачественных новообразованиях составляла не менее 70%. Образцы тканей опухоли были использованы для профилирования микроРНК на основе микроэррея – высокопроизводительного метода одномоментного скрининга нескольких тысяч молекул, в данном случае – микроРНК.

Культура клеток меланомы кожи человека линии BRO была получена в Институте клинической иммунологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. На проведение исследования получено разрешение Локального этического комитета

КрасГМУ (протокол №59 от 02.12.2014г).

Выделение РНК. Для выделения тотальной РНК образцы, фиксированные формалином и заключенные в парафин, подвергали диссекции на срезы толщиной 15 мкм при помощи микротома и депарафинировали ксилолом с последующей двукратной отмывкой 96% этанолом. Выделение тотальной РНК производили при помощи набора реагентов Recover All Nucleic Acid Isolation kit (Invitrogen, Vilnius, Литва) в соответствии с протоколом производителя. Концентрация выделенных микроРНК определялась на приборе Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, Сингапур) с использованием комплекта реагентов для определения концентрации микроРНК microRNA Assay (Molecular probes, Life Technologies, Сингапур). Для постановки реакции микрочипирования использовали растворы очищенной РНК в концентрации 21,2-33,2 нг/мкл.

Микрочипирование. Исследование экспрессионного профиля микроРНК проводили на системе GeneAtlas ™ Microarray компании (Affymetrix, Santa Clara, США) на базе микроРНК (miRBase Release 20).

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ сигнальных путей, регулируемых микроРНК, экспрессионный уровень которых был повышен в меланоме по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи, проводили на базе веб-ресурса KEGG (Киотская классификация генов и геномов), который включен в веб-сервис DIANA miRPath v.3.0. (http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/) с использованием трех баз данных: TargetScan v.7.0, microT-CDS v.5.0 и TarBase v.8.0. Также использовалась база данных PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System для исследования характеристик белков, синтезируемых с мишеневых генов.

Культивирование клеток линии BRO. Клеточную линию меланомы BRO культивировали в питательной среде RPMI Medium 1640 с L-глутамином с добавлением фетальной бычьей сыворотки Fetal Bovine Serum в концентрации 10%. Культивирирование проводили в CO_2-инкубаторе при содержании углекислого газа 5% и температуре 37°С.

Трансфекция клеток ингибитором miR-4286. Трансфекцию специфического ингибитора микроРНК miR–4286 (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, США) и негативного контроля - anti-miR negative control (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, США) осуществляли в 24-луночном планшете при концентрации клеток $1x10^5$ клеток/мл по протоколу производителя, с помощью Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, США).

Исследование миграции клеток. Исследование миграционной активности клеток меланомы BRO под действием ингибитора miR-4286 производили по методу «царапины» («scratch-test»). Для этого клеточную культуру культивировали до достижения плотности покрытия 80%, затем пластиковым наконечником наносили «царапины» в лунках с клеточной культурой и после дважды промывали в фосфатно-солевом растворе. Далее осуществляли смену питательной среды с 1% содержанием FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, Life Technologies, США). Визуализацию осуществляли на инвертированном микроскопе (ЛОМО, Россия) с использованием камеры INFINITY 1.0 (Lumenera Corporation, Канада) сразу после нанесения царапины, через 12 ч и через 24 часа в одних и тех же участках с помощью программного обеспечения INFINITY ANALYZE Release 6.5. (Lumenera Corporation, Канада). Скорость миграции клеток оценивали по изменению площади царапины при помощи программы INFINITY ANALYZE Release 6.5. (Lumenera Corporation, Канада).

Анализ клеточного цикла. Для оценки клеточного цикла клетки через 24 часа после трансфекции снимали с подложки 0,25% раствором трипсина-ЭДТА, промывали холодным 0,01М фосфатно-солевым буфером (Биолот, г.Санкт-Петербург). Клетки фиксировали добавлением к осадку по каплям 500 мкл 70% этанола при помешивании и

последующей инкубации в течение часа при температуре 4°С. После повторной отмывки 0,01М фосфатно-солевым буфером, фиксированные клетки обрабатывали РНКазой посредством нанесения 10 мкг РНКазы в растворе на осадок. Инкубировали с РНКазой 30 мин при 37°С. Впоследствии окрашивали клетки пропидия йодидом - 100 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере – в течение 3 часов в темноте при температуре 4°С. Определение фаз клеточного цикла проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США) в 3 технологических повторах.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных микрочипирования использовалось программное обеспечение Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix, Santa Clara, США), использующее непараметрический метод анализа ANOVA и корректировку по FDR (ложноположительному коэффициенту).

Для оценки результатов по миграции клеток и клеточному циклу использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение экспрессионного профиля микроРНК в меланоме и доброкачественных меланоцитарных новообразованиях методом микрочипирования

При анализе результатов профилирования микроРНК в меланоме и доброкачественных меланоцитарных новообразованиях было выявлено статистически значимое различие в 2 и более раза по 621 некодирующей молекуле, включая как зрелые микроРНК, так и их предшественники, а также малые некодирующие РНК, не отнесенные к классу микроРНК по различным причинам. Из них 446 принадлежат к классу микроРНК. Однако корректировка данных по коэффициенту ложноположительных результатов (false discovery rate – FDR) привела к значительному изменению значимости результатов. По итогам корректировки, статистическую значимость сохранили лишь 2 микроРНК: miR-4306 (превышение уровня в меланоме в сравнении с меланоцитарными невусами в 16,15 раз, $p_{FDR} = 0,036$) и miR-6853-3p (снижение в меланоме в сравнении с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями в 2,11 раз, $p_{FDR} = 0,036$).

Биоинформатический анализ

Для оценки предполагаемых функции двух измененных микроРНК в развитии меланомы был произведен анализ их генов-мишеней, сигнальных путей и ассоциированных биологических процессов при помощи баз данных.

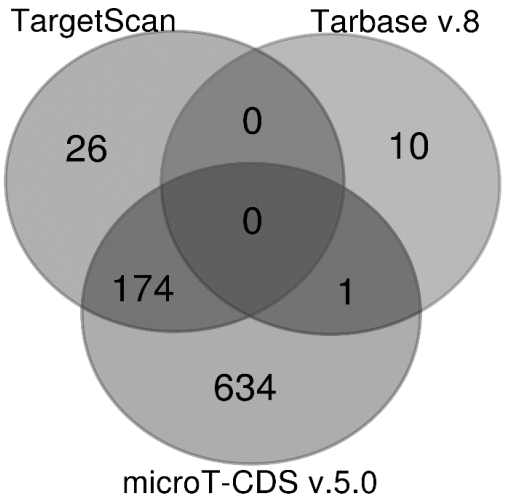


Рис. 1. Диаграмма Эйлера-Венна для генов мишеней микроРНК miR-4306 по результатам трех баз данных.

МикроРНК miR-4306 имеет лишь 11 генов-мишеней в базе Tarbase v.8, однако в базах microT-CDS v.5.0 и TargetScan 7.2 их значительно больше: 811 и 201 соответственно. Объединение списков генов-мишеней при помощи диаграммы Эйлера-Венна позволило выявить 174 гена-мишени, отмеченных в двух базах данных, тогда как пересечения результатов с базой Tarbase v.8 практически отсутствовало (Рис.1).

Анализ характеристик белков, ассоциированных с данными генами, а также их вовлеченности в клеточные процессы показал, что большое количество генов-мишеней miR-4306 относятся к белкам клеточной адгезии и выполняют функции межклеточных взаимодействии. В остальном же микроРНК miR-4306 продемонстрировала участие в большом количестве клеточных процессов, не проявив специфичности. Так, на втором месте среди генов-мишеней данной микроРНК находятся белки, обладающие каталитической активностью и регуляторы молекулярных процессов, включая транскрипцию генов. Сигнальные пути, ассоциированные с отобранными генами-мишенями представлены главным образом «Сигнальным путем кадгеринов» и «Wnt-сигнальным путем». Учитывая результаты анализа miR-4306 можно предположить ее высокую вовлеченность в процессы клеточной адгезии и возможную ассоциацию с подвижностью и инвазивностью клеток меланомы.

Другая значимо измененная микроРНК miR-6853-3p является менее изученной и представлена лишь в двух базах данных из трех исследованных. При этом в базе TargetScan для нее предсказано лишь 19 генов-мишеней. При сопоставлении с данными базы MicroT-CDS (589 генов-мишеней) при помощи диаграммы Эйлера-Венна, все 19 генов-мишеней оказались общими, представленными в обеих базах. Анализ белков, синтез которых происходит с этих генов, показал неспецифические характеристики и функции. 19 исследуемых генов представлены трансмембранными белками-рецепторами, ферментами, транспортными белками и другими. Среди молекулярных функций генов-мишеней описаны функции межклеточной коммуникации, далее следует транспортная и каталитическая активность. Среди биологических процессов, регулируемых данными генами-мишенями преобладают общие клеточные процессы и регуляция метаболизма.

Среди сигнальных путей, ассоциированных с экспрессией генов-мишеней микроРНК miR-6853-3p, отмечены «Сигнальный путь глутамата» и «Сигнальный путь развития болезни Гентингтона».

Таким образом, профили микроРНК в меланоме и доброкачественных меланоцитарных новообразованиях в целом не имеют значимых различий, указывая на единство сущности клеток. Этот результат был получен при помощи корректировки данных в больших массивах по критерию FDR. Тем не менее, отсутствие значимых различий в целом не означает, что следует пренебречь отличиями в экспрессии отдельных микроРНК, пусть их роль и не является ключевой при меланомогенезе. Поэтому в дальнейшем был произведен анализ микроРНК, наиболее различающихся по уровням экспрессии в меланоме и меланоцитарных невусах по данным ANOVA-теста без корректировки по FDR. При детальном рассмотрении были выявлены топ-20 зрелых микроРНК, имеющих наибольшую кратность изменений уровня в меланоме в сравнении с невусами: 10 микроРНК, повышенно экспрессирующихся в меланоме (Таблица 1), и 10 микроРНК с максимальным снижением экспрессии (Таблица 2).

Таблица 1.

10 микроРНК с максимально высокими уровнями экспрессии в меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами

МикроРНК	Кратность различий	p-value
hsa-miR-3135b	30,39	0,015581
hsa-miR-4286	27,6	0,001383
hsa-miR-155-5p	24,28	0,010248
hsa-miR-3651	23,29	0,031757
hsa-miR-378f	23,14	0,047756
hsa-miR-362-5p	23,09	0,04345
hsa-miR-4433-3p	21,45	0,01469
hsa-miR-3197	21,37	0,010996
hsa-miR-1246	20,71	0,020654
hsa-miR-151a-3p	19,73	0,022794

Таблица 2.

10 микроРНК с максимально низкими уровнями экспрессии в меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами

МикроРНК	Кратность различий	p-value
hsa-miR-211-5p	94,23	0,005263
hsa-miR-508-5p	24,02	0,048518
hsa-miR-6740-3p	11,07	0,021449
hsa-miR-3591-3p	10,42	0,009236
hsa-miR-449b-3p	10,26	0,030651
hsa-miR-1229-3p	9,22	0,025968
hsa-miR-6814-3p	8,56	0,020243
hsa-miR-6736-3p	8,28	0,019751

hsa-miR-891a-5p	8,2	0,003513
hsa-miR-6788-3p	8,1	0,025966

МикроРНК miR-3135b, стоящая первой в списке повышенных микроРНК (кратность различий 30,39), изучена мало и не описывалась ранее при меланоме. Тем не менее, для нее показано изменение экспрессии в клетках рака молочной железы (Chu J. et al., 2015), что может указывать на ее вовлеченность в процессы онкогенеза.

На втором месте по уровню экспрессии была отмечена микроРНК miR-4286. Ее роль в меланомогенезе также крайне мало исследована. Тем не менее, именно она была отмечена в работе по исследованию меланомы зарубежными исследователями M. Sand и коллегами (Sand M. et al., 2013), как имеющая более высокий уровень в клетках меланомы в сравнении со здоровыми меланоцитами. Для этой микроРНК были обнаружены отдельные публикации, предполагающие ее участие в канцерогенезе при других видах новообразований (An X. et al, 2019; Li Z. et al., 2019).

Обращает внимание, что среди микроРНК с максимально повышенным уровнем экспрессии оказалась микроРНК-155-5p (кратность изменения 24,48), для которой описано онкогенное действие при различных видах онкологических заболеваний. В целом, микроРНК-155-5p очень хорошо изучена и рассматривается в литературе как перспективная диагностическая и прогностическая молекула при меланоме (Levati L. et al., 2009; Neagu M. et al., 2020).

С помощью баз данных был осуществлен биоинформатический анализ сигнальных путей, регулируемых микроРНК, измененными в меланоме по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи. Анализ 10 микроРНК, имеющих максимально повышенный уровень в клетках меланомы в сравнении с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями, выявил их активную вовлеченность в клеточные процессы, ассоциированные с онкогенезом. Согласно базе данных Tarbase v.7.0, для этой группы микроРНК характерна ассоциация с 40 сигнальными путями, среди которых 11 связаны с формированием онкологических заболеваний, включая глиому, рак легких, поджелудочной железы, мочевого пузыря, эндометрия, простаты и др., а также онкогематологических заболеваний – острого и хронического миелолейкоза. В числе онкологических заболеваний присутствует меланома, в развитии которой, согласно базе данных, участвует 7 из 10 микроРНК из списка сверхэкспрессируемых. Еще одна группа сигнальных путей, регулируемых микроРНК, имеющих максимально повышенный уровень в клетках меланомы, включает клеточные процессы, напрямую связанные с развитием злокачественных новообразований. К ним относятся «Сигнальный путь апоптоза», «Сигнальный путь фактора некроза опухоли» (TNF-α), «Сигнальный путь фактора роста опухоли» (TGF-β), а также «Сигнальный путь канцерогенеза вирусной природы», «Сигнальный путь p53» и др. Семь сигнальных путей из 40 связаны с метаболизмом жирных кислот в клетке и их производных, что по данным литературы, может быть ассоциировано с меланомогенезом.

Таким образом, согласно данным микрочипирования, микроРНК miR-4286 была выбрана для более детального изучения как вероятный участник меланомогенеза, с возможным потенциалом для модуляции ее уровня с целью определения предполагаемых терапевтических эффектов. В этой связи, на следующем этапе работы был произведен биоинформатический анализ для микроРНК miR-4286.

По результатам биоинформатического анализа сигнальных путей, в регуляции

которых принимает участие микроРНК miR-4286, определены 6 значимых путей сигнальной трансдукции (с корректировкой по FDR <0,05). К числу таких путей относится «Сигнальный путь биосинтеза N-гликанов» (N-Glycan biosynthesis), «Сигнальный путь биосинтеза жирных кислот» (Fatty acid biosynthesis), «Сигнальный путь метаболизма тирозина» (Tyrosine metabolism), «Сигнальный путь развития глиомы» (Glioma). Полный перечень сигнальных путей представлен в таблице 3.

Таблица 3.

Сигнальные пути, регулируемые микроРНК miR-4286, по результатам биоинформатического анализа

№	Наименования сигнальных путей*	p-value
1.	«Fatty acid biosynthesis» (hsa00061)	3.66501273758e-36
2.	«Hepatitis B» (hsa05161)	0.00932535377102
3.	«Glioma» (hsa05214)	0.0135616225348
4.	«N-Glycan biosynthesis» (hsa00510)	0.0443359381802
5.	«GABAergic synapse» (hsa04727)	0.000332840871776
6.	«Tyrosine metabolism» (hsa00350)	0.00346497937317

Примечание. * Наименования сигнальных путей приводятся в соответствии с базой данных DIANA miRPath v.3.0.

Далее был произведен поиск предсказанных генов-мишеней для микроРНК miR-4286 с использованием баз данных. По результатам анализа, гены-мишени miR-4286 расценивались как имеющие важное биологическое значение лишь в том случае, если они встречались хотя бы в двух базах данных. Для выбора таких мишеней была использована диаграмма Эйлера-Венна (Рис. 2). С ее помощью было выявлено, что всего 71 ген-мишень имели пересечения в двух и более баз данных. Из них общими по трем базам данных являются 3 гена-мишени, это такие гены-мишени, как *RRN3, PIM1 и RHEBL1*. 52 гена-мишени имеют пересечения в базах данных TargetScan и microT-CDS. В свою очередь базы данных Tarbase и TargetScan имеют общих 9 генов-мишеней, а также 7 общих генов-мишеней у баз данных microT-CDS и Tarbase.

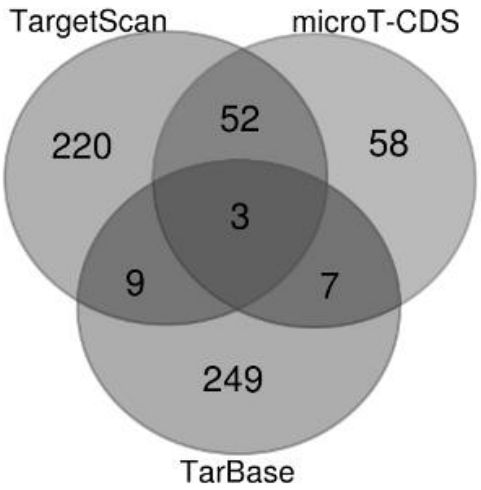


Рис. 2. Диаграмма Эйлера-Венна, показывающая количество общих генов-мишеней

микроРНК miR-4286 по результатам трех баз данных.

Среди мишеней miR-4286 обнаруживаются гены, кодируемые белки которых участвуют в ключевых клеточных процессах: дифференцировка, гибель, пролиферация *(PIM1, RHEBL1, GLUL, EEF2K, PTPRF, FOX04, RNF157, GFRA1, RORB, DMTF1, MED1, PSMD11, SOX30, FAM96A).* Кроме того, обнаружены гены, отвечающие за клеточную миграцию и адгезию *(MINK1, LRRC4, TBC1D10C, PTPRF, PLXNA2).* Большая группа генов-мишеней, по данным литературы, может быть отнесена к онкогенам: *PIM1, RHEBL1, PLXNA2, FOX04, PTPRF, ZNF148, PSMD11, LRRC4,PHF1, XG, SOX30, TMEM132C, C21orf49, PDE4C, MAP2K7, TBC1D10C, EEF2K, GLUL, POU4F1, TAF15, MINK1, TSKU, HMGA1*. Также есть супрессоры опухолей: *INTS6, TMEM104, HEPACAM, FAM96A*. Кроме того, среди мишеней присутствуют гены, участвующие в метаболизме глюкозы, липидов, аминокислот, а также отвечающие за ионный транспорт *(MED1, EEF2K, PTPRF, PPIL1, GABRA3, KCNA7, ST6GALNAC6)*. Следует выделить группу генов-мишеней, участвующих в различных этапах экспрессии генов: транскрипции *(RRN3, AGO1, INTS6, FOXO4, SECISBP2L, MED1, GTF3C4, TBX21, SOX30, C6orf132, ZNF641, ZBTB7B, RNF157, TBX15, ZNF629, ZNF740, DMTF1, PBX2),* сплайсинге *(KIAA0907, PPIL1)*, созревании микроРНК *(AGO4)*. Нельзя не отметить еще одну группу генов, встречающихся среди мишеней микроРНК-4286, это гены, участвующие в развитии нервных клеток и ассоциированные с нейродегенеративными заболеваниями *(PLXNA2, GFRA1, RNF157, GABRA3, KCNA7, GABBR1).*

По данным анализа классов белков, молекулярных функций и задействованных биологических процессов, было отмечено, что среди мишеней исследуемой микроРНК отдельную группу составляют гены, кодирующие белки, участвующие в реализации генетической информации клетки через регуляцию транскрипции. Большое количество белков выполняют регуляторные функции и функции связывания белков и ферментативного катализа. Это позволяет утверждать вовлеченность miR-4286 в широкий спектр общих клеточных процессов, без привязки к отдельным специфическим функциям. Сигнальные пути, затронутые мишеневыми генами, включают общеклеточные процессы (клеточный цикл, апоптоз, реакция на окислительный стресс, транскрипция генов), метаболические превращения (глутамина в глутамат, сукцината в пропионат), пути регуляции (гормоны, факторы роста) и др.

Тем не менее, среди общебиологических функций в работе белков присутствуют и регуляторы более специфического процесса – передвижения клеток. Это белки клеточного связывания и локомоторные белки. Присутствие данной группы позволило предположить возможность воздействия на миграцию клеток через ингибирование miR-4286. Таким образом, по результатам подробного исследования каждого из генов-мишеней микроРНК miR-4286, можно заключить, что данная регуляторная молекула вовлечена в ключевые процессы канцерогенеза и меланомогенеза, регулируя клеточную миграцию, адгезию, пролиферацию и апоптоз.

Полученные данные позволили предполагать значимый эффект микроРНК miR-4286 на фенотип клеток меланомы. При этом ее повышенная экспрессия в клетках меланомы указывает на возможное онкогенное действие, стимулирующее рост опухоли. Для подтверждения выдвинутой гипотезы был проведен ряд экспериментов *in vitro* с целью оценки влияния ингибирования микроРНК miR-4286 на функциональные свойства

клеток меланомы. Для изучения влияния miR-4286 был выбран метод ее ингибирования в модельных клетках меланомы с последующим изучением изменений в клеточном цикле и в способности клеток к миграции.

Оценка эффективности трансфекции методом ПЦР в реальном времени

Трансфекция ингибитора микроРНК предварительно была проверена на контрольной молекуле miR-let-7c. Эффективность трансфекции была подтверждена методом детекции изменения уровня мишени для let-7c – матричной РНК белка *HMGA2*. Было выявлено статистически значимое (p = 0,0495) увеличение уровня экспрессии *HMGA2* в клетках, трансфецированных ингибитором miR-let-7c относительно клеток, трансфецированных отрицательным контролем (Рис. 3).

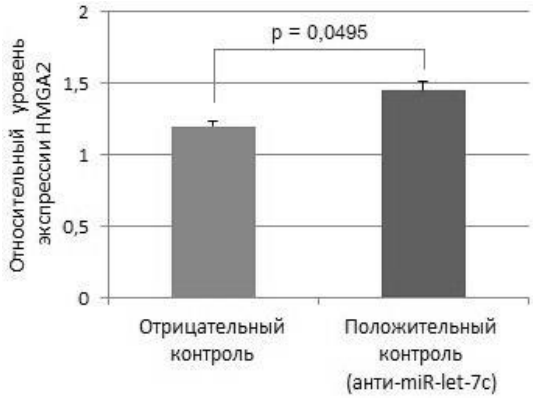


Рис. 3. Результаты оценки эффективности трансфекции: статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК HMGA2 в положительном контроле подтверждает ингибирование микроРНК miR-let-7c. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего.

По результатам подтвержденной эффективности трансфекции контрольной молекулой, в клетки по той же методике были введены ингибиторы miR-4286.

Влияние ингибирования микроРНК miR-4286 на динамику клеточного цикла

По результатам проточной цитофлоуриметрии было выявлено, что после внедрения в клетку специфического ингибитора микроРНК miR-4286 происходит достоверное увеличение доли клеток, находящихся в фазе S-G2 ($p<0,05$). Это указывает на повышение числа клеток в фазе G2 с возможным снижением перехода в фазу митоза. Доли клеток, находящихся в фазе G1, в сравниваемых группах были одинаковы, несмотря на отмечающуюся тенденцию к снижению процента таких клеток после ингибирования miR-4286. Данные представлены на рисунке 4.

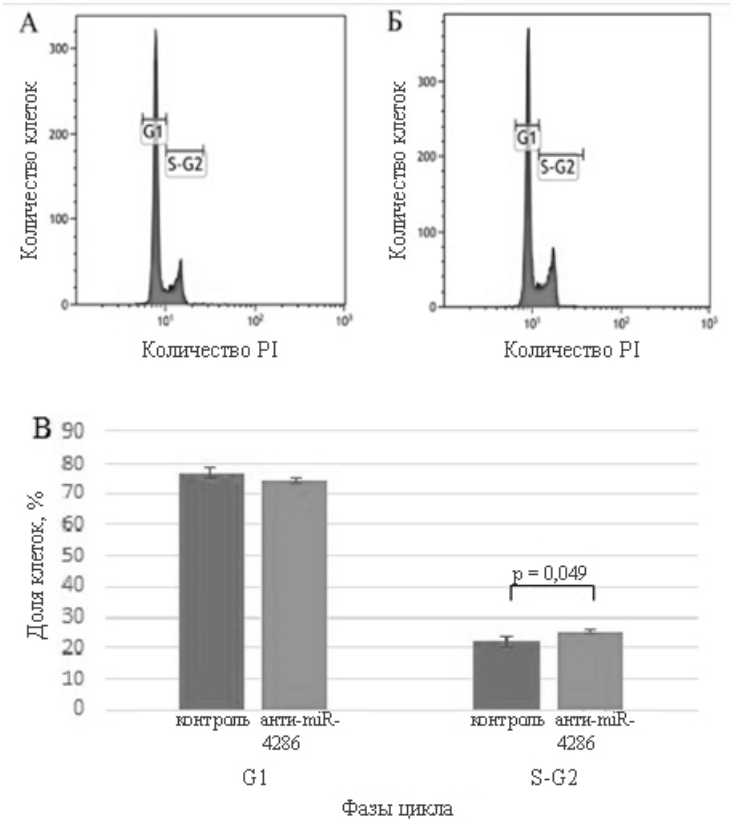


Рис. 4. Анализ фаз клеточного цикла меланомы BRO после трансфекции ингибитора микроРНК miR-4286. А - распределение клеток меланомы BRO по интенсивности окраски PI (йодистый пропидий) в контроле (по оси абсцисс интенсивность флуоресценции клеток меланомы, окрашенных йодистым пропидием; по оси ординат – интенсивность флуоресценции (йодистый пропидий). Б - распределение клеток меланомы BRO по интенсивности окраски йодистым пропидием после трансфекции ингибитора микроРНК miR-4286. В - изменения фаз клеточного цикла меланомы BRO после трансфекции ингибитора микроРНК miR-4286 в сравнении с контролем. Достоверное увеличение процента клеток в фазе S-G2 ($p<0,05$).

Таким образом, ингибирование микроРНК miR-4286 замедляет переход клеток меланомы от фазы G2 к митозу на 16%, демонстрируя тем самым супрессивный эффект на пролиферацию и подтверждая гипотезу о возможном онкогенном влиянии miR-4286.

Влияние ингибирования микроРНК miR-4286 на миграцию клеток меланомы BRO

Анализ миграционной активности клеток показал, что при ингибировании miR-4286 скорость движения клеток для заполнения пространства царапины значимо снижается уже через 24 часа после воздействия ингибитора. Это отразилось в различиях площади царапины: в группе ингибирования площадь царапины через сутки была больше, чем в контрольной группе в 1,4 раза ($p=0,02$) (Рис. 5).

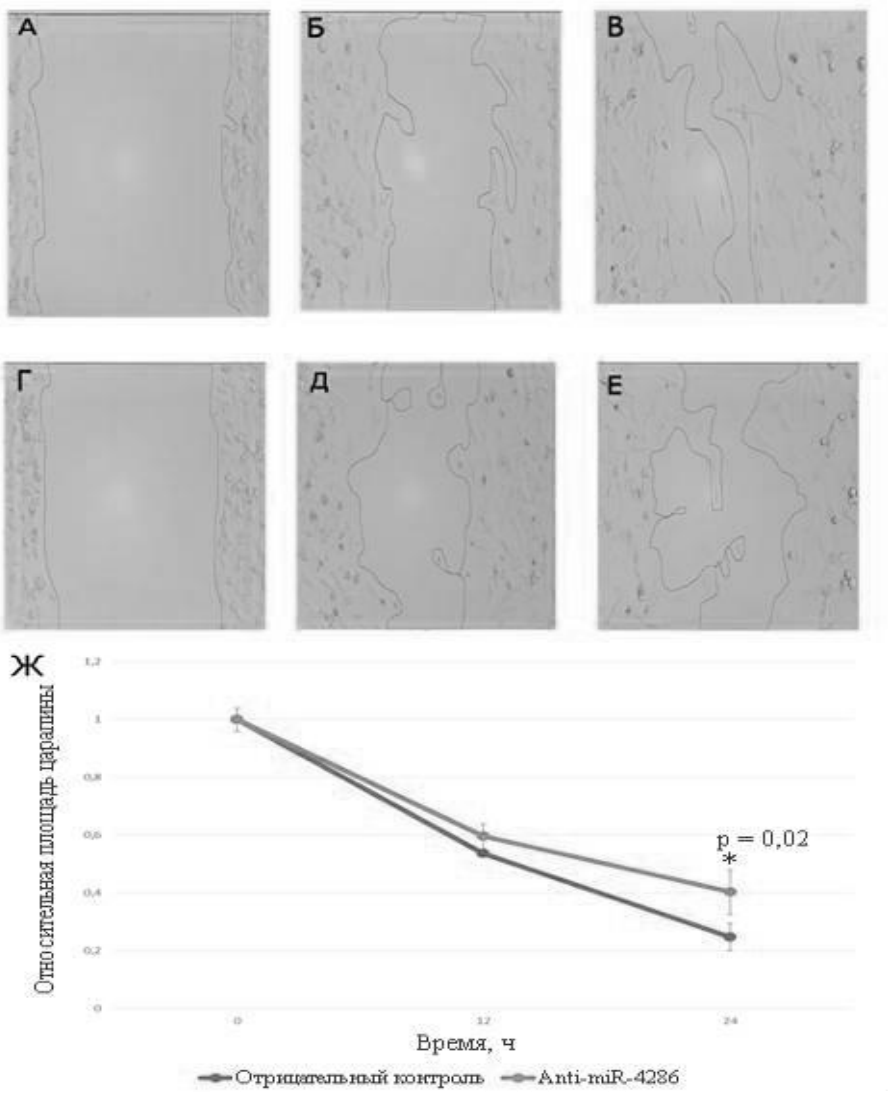


Рис. 5. Анализ миграционной активности клеток меланомы BRO после трансфекции контроля и ингибитора микроРНК miR-4286 при помощи «скрэтч-теста» (увеличение микроскопа 150×). А-В – микрофотографии монослоя клеточной культуры меланомы BRO, отбражающие площадь царапины в динамике, отрицательный контроль: А - начальная временная точка; Б - через 12ч; В - через 24ч; Г-Е – микрофотографии монослоя клеточной культуры меланомы BRO, отбражающие площадь царапины в динамике, ингибитор микроРНК anti-miR-4286: Г - начальная временная точка; Д - через 12ч; Е - через 24ч; Ж - изменение площади царапины во времени. Статистически значимые изменения площади царапины отмечались через 24 часа после ингибирования микроРНК miR-4286 ($p<0,05$).

Таким образом, использование специфического ингибитора микроРНК miR-4286 статистически значимо приводит к снижению миграционной активности клеток меланомы BRO на 11% относительно контрольной группы.

В целом, стоит резюмировать, что уровни экспрессии микроРНК в меланоме схожи с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями. Сигнальные пути, а также гены-мишени микроРНК miR-4286, экспрессионный уровень которой был повышен в

меланоме, регулируют фундаментальные аспекты канцерогенеза меланомы. Ингибирование микроРНК miR-4286 приводит к торможению перехода клеток меланомы от фазы G2 к митозу, а также достоверно замедляет миграцию клеток меланомы BRO.

По результатам анализа полученных данных предложены возможные пути влияния микроРНК-4286 на пролиферацию и миграцию клеток опухоли через регулируемые данной микроРНК внутриклеточные механизмы передачи сигнала (Рис. 6).

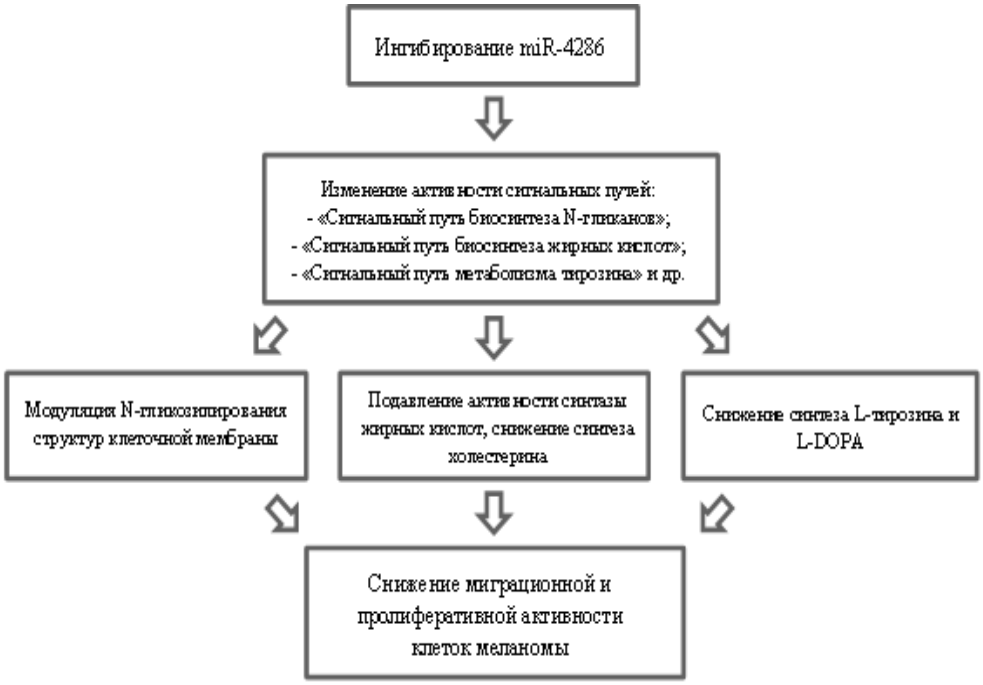


Рис. 6. Возможный механизм снижения миграции и пролиферации клеток меланомы BRO при ингибировании микроРНК miR-4286

ВЫВОДЫ

1. Анализ профилей экспрессии микроРНК показал, что уровни экспрессии 446 микроРНК разнятся при меланоме по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями. К микроРНК с повышенной экспрессией в меланоме относятся: miR-4306, miR-3135b, miR-4286, miR-155-5p, miR-3651, со сниженной экспрессией в меланоме относятся: miR-6853-3p, miR-211-5p, miR-508-5p, miR-6740-3p, miR-3591-3p по сравнению с меланоцитарными новообразованиями кожи.
2. Профиль микроРНК при меланоме кожи характеризуется повышением уровня микроРНК, регулирующих гены-компоненты внутриклеточных механизмов передачи сигнала – «Биосинтез жирных кислот», «Метаболизм жирных кислот», «Сигнальный путь развития меланомы», «Сигнальный путь развития рака поджелудочной железы», «Сигнальный путь развития глиомы». Напротив, при доброкачественных меланоцитарных новообразованиях кожи, повышается уровень микроРНК, гены-мишени которых регулируют компоненты внутриклеточных сигнальных каскадов «Процессинг и

презентация антигена», «Процессинг белков в эндоплазматическом ретикулуме», «Взаимодействие цитокинов с цитокиновым рецептором».

3. По результатам биоинформатического анализа определено, что генами-мишенями miR-4286 являются PIM1, RHEBL1, GLUL, MINK1, PLXNA2, PTPRF, GFRA1, RORB, DMTF1, MED1, PSMD11, SOX30 и FAM96A, участвующие в связанных с канцерогенезом процессах, таких как деление, дифференцировка и гибель клеток. Помимо этого, miR-4286 регулирует экспрессию генов-компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов, таких как «Сигнальный путь биосинтеза N-гликанов», «Сигнальный путь биосинтеза жирных кислот» и «Сигнальный путь развития глиомы».

4. Ингибирование микроРНК miR-4286 посредством трансфекции ее специфического ингибитора в клетки меланомы, вызывает статистически значимое снижение их миграционной способности на 11%, а также статистически значимое повышение процента клеток, находящихся в фазах S и G2 клеточного цикла на 16%, что указывает на роль miR-4286 в регуляции пролиферации и миграции клеток меланомы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РАБОТЕ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
кДНК – комплементарная ДНК;
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
FDR – (сокр. от англ. false discovery rate) коэффициент ложноположительных результатов ≤ 0,05;

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Комина А.В., Цыренжапова С.В., Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Проблема гетерогенности опухоли и роль опухолевого микроокружения в диагностике и создании терапии меланомы // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. - 2017. - Т.28, №1. - С.12-22.
2. Цыренжапова С.В., Сергеева Е.Ю., Аксененко М.Б., Палкина Н.В., Комина А.В., Рукша Т.Г. Снижение миграционной активности и пролиферации клеток меланомы BRO при ингибировании микроРНК-4286 // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2017. - Т.20, №4. - С.196-200.
3. Komina A., Palkina N., Aksenenko M., Tsyrenzhapova S., Ruksha T. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of miR-4286 inhibition in melanoma cells // PLOS One. - 2016. - Vol.12, №11. - P.1-17.
4. Komina A.V., Palkina N.V., Tsyrenzhapova S.V., Aksenenko M.B., Shvetsova Y.I., Ruksha T.G. MicroRNA expression alterations during melanoma progression and metastasis development // Journal of Investigative Dermatology. - 2015. - Vol.135, №2. - P.25.
5. Комина А.В., Палкина Н.В., Цыренжапова С.В. Анализ профилирования микроРНК

при меланоме кожи и меланоцитарных новообразованиях кожи // Актуальные проблемы патофизиологии: XXI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием. – г.Санкт-Петербург, Издательство СПбГМУ. - 2015. - С.75-77.

6. Цыренжапова С.В., Белоногов Р.Н., Палкина Н.В., Рукша Т.Г. Ингибирование микроРНК miR-4286 вызывает плексин-опосредованное снижение миграции клеток меланомы. XXXVIII Международная научно-практическая конференция «Российская наука в современном мире». – г.Москва, Научно-издательский центр «Актуальность.РФ». – 2021. – С.55-57.



Соискатель С.В. Цыренжапова