АННОТАЦИЯ
Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
По специальности «6D070100-Биотехнология»

Айсиной Даны Евгеньевны

Взаимодействие miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы

Общая характеристика работы

Работа посвящена изучению взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы, и поиску новых диагностических маркеров на основе ассоциаций miRNA и кандидатных генов для ранней диагностики рака молочной железы.

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) занимает одно из первых мест среди всех онкологических заболеваний во всем мире. Данные статистики последних лет демонстрируют интенсивный, неуклонный рост заболеваемости и смертности от рака молочной железы в Казахстане и других странах.

В последнее время, проводится много исследований по диагностике рака молочной железы с использованием miRNA, которые играют ключевую роль в пост-транскрипционной регуляции генов, вовлеченных в ключевые биологические процессы, а именно пролиферацию, дифференцировку, ангиогенез, миграцию, апоптоз и канцерогенез. Гены, связанные с раком молочной железы, могут быть мишенями для miRNA, которые регулируют экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне. В настоящее время в мире ещё не существует полной базы генов и miRNA, связанных с раком молочной железы. Поэтому необходимо выявление ассоциаций miRNA с генами, указывающих на рак молочной железы и его субтипы, которые могут быть биомаркерами для диагностики субтипов рака молочной железы и играть ключевую роль в его возникновении и развитии.

Цель работы: изучить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы.

Задачи исследования:

1. Создать базы данных по miRNA и генам, участвующим в развитии рака молочной железы.
2. Установить характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов семейства *E2F* и участие miR-1322 в развитии рака молочной железы.
3. Определить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа HER2 рака молочной железы.
4. Определить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипов luminal A и B рака молочной железы.
5. Определить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа triple-negative рака молочной железы.

6. Установить особенности взаимодействия пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA их генов-мишеней.

7. Установить ассоциации miRNA и mRNA генов для разработки методов диагностики рака молочной железы.

Объекты исследования: нуклеотидные последовательности miRNA и mRNA генов человека, участвующих в развитии рака молочной железы.

Предмет исследования: характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии РМЖ.

Методы исследования. Компьютерные методы предсказания сайтов связывания miRNA в mRNA генов на основе моделирования водородных связей с помощью программы MiRTarget.

Научная новизна исследования. Научная новизна и оригинальность исследования заключается во впервые установленных характеристиках взаимодействия miRNA с mRNA генов, связанных с развитием рака молочной железы. Сайты взаимодействия miRNA с mRNA были выявлены в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA генов-мишеней.

Впервые выявлено, что из 602 кандидатных генов рака молочной железы, только mRNA *E2F3* гена содержит множественные сайты для 22 miRNA в CDS. Было выявлено, что взаимосвязь сайтов связывания этой mRNA с miRNA сложились давно и на протяжении миллионов лет дивергенции изученных видов животных эти взаимосвязи практически не изменились.

Впервые установлена кластерная организация сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов РМЖ.

Впервые определены характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative (basal-like) рака молочной железы.

Впервые выявлены ассоциации miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы, которые предлагаются в качестве диагностических маркеров.

Теоретическая значимость работы заключается в установлении количественных характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов субтипов рака молочной железы и выявлении кластерной организации сайтов связывания. Такая организация сайтов связывания создает конкуренцию между miRNA при взаимодействии их с кластером и уменьшает участок mRNA занимаемый сайтами связывания.

Практическая ценность исследования заключается в разработке основ метода ранней диагностики субтипов рака молочной железы с использованием ассоциаций miRNA и генов-мишеней.

Полученные результаты используются при чтении дисциплины «Бионанотехнологии в диагностике и терапии».

Основные положения, выносимые на защиту:

Из 602 кандидатных генов рака молочной железы 325 кандидатных генов, включающих специфичные гены субтипов заболевания, являются мишенями miRNA и их экспрессия может регулироваться этими miRNA.

Сайты связывания miRNA находятся в 5’UTR, CDS и 3’UTR mRNA кандидатных генов рака молочной железы. Распределение сайтов связывания miRNA в 5’UTR, CDS или 3’UTR специфично для каждого из генов.

Большинство кандидатных генов являются мишенью одной или нескольких miRNA сайты связывания которых расположены в mRNA отдельно друг от друга. В mRNA других кандидатных генов сайты связывания miRNA расположены с наложением нуклеотидных последовательностей образуя кластеры сайтов связывания двух и более miRNA.

Для субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative имеются специфические ассоциации miRNA и mRNA кандидатных генов разных субтипов.

Несколько пар miRNA-5p и miRNA-3p, происходящих из одной pre-miRNA, взаимодействуют с mRNA их генов-мишеней полностью комплементарно.

Основные результаты исследований и выводы:

Полученные в работе результаты дают основание сделать следующие положения.

Установленные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов E2F демонстрируют возможность регуляции экспресии генов семейства *E2F* с помощью многих miRNA. Гены *E2F1-E2F3*, участвующие в клеточном цикле, и гены *E2F4-E2F8*, участвующие в апоптозе, в разной степени подвержены влиянию miRNA.

Установлены гены, которые участвуют в развитии рака молочной железы и являются мишенями для miR-1322. Особенностью mRNA этих генов является кодирование сайтами связывания miR-1322 гомоолигопептидов.

Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов специфичны для каждого субтипа рака молочной железы, и могут использоваться при подборе ассоциаций для ранней диагностики субтипов РМЖ. В каждой группе кандидатных генов имеются ассоциации miRNA и их генов мишеней, которые имеют повышенную степень взаимодействия и могут служить маркерами для разработки методов ранней диагностики субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative.

Средняя величина свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов всех субтипов больше в 5'UTR и CDS по сравнению с 3'UTR, что предполагает предпочтительное связывание miRNA в 5'UTR и CDS.

Организация сайтов связывания miRNA с mRNA в кластеры, содержащие два и более сайтов связывания с наложением их нуклеотидных последовательностей, позволяет многократно уменьшить долю нуклеотидных последовательностей сайтов связывания в нуклеотидной последовательности mRNA. Наложение сайтов связывания miRNA создает конкуренцию между miRNA за сайты связывания в кластере, так как комплекс RISC с miRNA, имеющей большую величину свободной энергии взаимодействия не позволит связываться другому комплексу RISC с miRNA, имеющей более слабое взаимодействие с mRNA.

Гены *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* из 17508 генов человека, являются мишенями miRNA, связывающимися полностью

комплементарно с их mRNA. Высокая консервативность сайтов связывания miRNA в mRNA генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* в течение десятков миллионов лет эволюции изучаемых видов животных подтверждает, что miRNA-опосредованная регуляция экспрессии этих генов появилась на ранних этапах эволюции животных. Ассоциации пяти пар miR-5p/miR-3p с mRNA генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* могут служить основой разработки методов ранней диагностики рака молочной железы.

В результате проведённых исследований можно сделать следующие **выводы:**

1. В формате для использования программой MirTarget созданы базы из 6226 miRNA и 602 кандидатных генов рака молочной железы для расчета характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов мишеней. Созданы выборки кандидатных генов субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative рака молочной железы.

2. Установлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов E2F которые участвуют в регуляции клеточного цикла (*E2F1-E2F3*) и апоптоза (*E2F4-E2F8*). Некоторые гены, участвующие в развитии рака молочной железы, являются мишенями для miR-1322, полисайты связывания которой кодируют олигопептиды.

3. Определены начало и локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 31 кандидатных генов субтипа HER2 рака молочной железы.

4. Сайты связывания miRNA обнаружены в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, предсказана их структурная организация, вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 20 кандидатных генов субтипов luminal A и B рака молочной железы.

5. Вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, определены начало и локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 50 кандидатных генов субтипа triple-negative рака молочной железы.

6. В каждой из mRNA 101 кандидатных генов рака молочной железы установлена локализация сайтов связывания miRNA. В mRNA 25 генов выявлена организация сайтов связывания miRNA в кластеры, состоящие из сайтов связывания двух и более miRNA. Кластерная организация сайтов связывания приводит к компактизации сайтов связывания и конкуренции miRNA за связывание в кластере.

7. Установлены характеристики сайтов связывания пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA ортологичных генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B*, которые были сходными, что свидетельствует о раннем возникновении и высокой консервативности связи miRNA с mRNA у гоминидов. Выявлены ассоциации пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA генов-мишеней для разработки методов диагностики рака молочной железы.

8. Выявленные семь, семь и одиннадцать ассоциации miRNA и кандидатных генов соответственно субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative рака молочной железы рекомендуются для разработки методов диагностики этих субтипов.

Все поставленные в диссертации задачи выполнены.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках проектов «Разработки тест-систем ранней диагностики сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний на основе ассоциаций miRNA и их генов мишеней» № AP05132460 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены:

- на международных научных конференциях студентов и молодых учёных «Фараби алеми», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, 2017 г. и 2018 г.;
- на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биотехнологии, экологии и физико-химической биологии», Алматы, 6-7 апреля 2017 г.;
- на IX международном конгрессе «Biotechnology: state and development prospects», Москва, Россия, 20-22 февраля, 2017 г.;
- во II всероссийской конференции с международным участием «High-throughput sequencing in genomics», Новосибирск, Россия, 18-23 июня, 2017 г.;
- на международной научно-практической конференции «The science of the new time: from idea to result», Санкт-Петербург, Россия, 18-19 августа 2017 г.;
- на международной конференции «Clinical proteomics. Postgenomic medicine» Москва, Россия, 30 октября-1 ноября 2017 г.;
- на международном форуме «Biotechnology: state and development prospects», Москва, Россия, 23-25 мая, 2018 г.;
- на 11 Международной конференции BGRS/SB-2018 «Integrative Bioinformatics and Systems Biology», WIBSB-2018, Новосибирск, Россия, 22-23 августа 2018 г.;
- на Московской международной конференции «Molecular phylogenetics and biobanking biodiversity» (Molphy-5), Москва, Россия, 25-28 августа, 2018 г.;
- на международной конференции «Biological markers in fundamental and clinical medicine», Прага, Чехия, 31 октября-02 ноября, 2018 г.;
- на международном конгрессе “Biotechnology: state of the art and perspectives”, Москва, Россия, 25-27 февраля, 2019 г.;
- на международной конференции «9-ая Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии MCCMB'19», Москва, Россия, 27-30 июля 2019 г.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 25 печатных работах, в том числе 1 статье в международном журнале с импакт-фактором, цитируемом в Web of Science; девять статей в республиканских научных журналах из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки; 15 тезисов в материалах международных конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список использованных источников из 290 наименований; содержит 60 таблиц и два рисунка.