# АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
По специальности «6D070100-Биотехнология»
Юриковой Оксаны Юрьевны
на тему: «Взаимодействие miRNA с кодирующей областью mRNA генов, связанных с некоторыми социально значимыми заболеваниями»

**Общая характеристика работы**

Работа посвящена изучению взаимодействия miRNA с кодирующей областью mRNA генов, связанных с некоторыми социально значимыми заболеваниями и поиску новых эффективных ассоциаций miRNA и их генов-мишеней для дальнейшего использования в диагностике этих заболеваний.

**Актуальность темы исследования.**

Социально значимые заболевания относятся к наиболее актуальным проблемам медицины. Для проведения эффективной профилактики этих заболеваний необходимо привлечение органов власти, сотрудников медицинской, образовательной сфер и др. Социально значимые заболевания приводят к утрате трудоспособности различных групп населения и преждевременной смертности. На решение проблем их профилактики, лечения и реабилитации выделяется большой объем финансирования. В число социально значимых заболеваний включены злокачественные новообразования, острый инфаркт миокарда (первые шесть месяцев), дегенеративные болезни нервной системы, демиелинизирующие болезни центральной нервной системы.

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из наиболее ведущих причин смертности в Казахстане и всем мире (17,9 миллионов смертей в 2016 году). В 85% случаев причинами являются возникновение инфаркта и инсульта.

Онкологические заболевания в структуре смертности населения Казахстана продолжают занимать второе место после сердечно-сосудистых. Наиболее распространенной формой злокачественных новообразований по частоте заболеваемости и смертности является рак легкого. Согласно информации, из базы данных GLOBOCAN в 2018 году зарегистрировано 1,76 миллионов смертей от рака легкого. По гистологическому строению различают два основных типа рака легкого: мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого. На немелкоклеточный рак легкого приходится 85% всех случаев рака легкого.

Изучение нейродегенеративных заболеваний является актуальной медицинской и научной проблемой, поскольку, несмотря на поиск причин их развития, они до сих пор остаются неизлечимыми. Во всем мире насчитывается около 50 миллионов людей с деменцией. Лекарственные препараты, используемые при нейродегенеративных заболеваниях, направлены на коррекцию симптомов. Одной из основных целей медицинской помощи в отношении деменции является раннее диагностирование для обеспечения раннего и оптимального ведения. Среди

нейродегенеративных заболеваний болезнь Альцгеймера является наиболее распространенной формой деменции в мире – на нее приходится 60-70% всех случаев деменций.

Поиск биомаркеров, позволяющих проводить минимально инвазивную раннюю диагностику социально значимых заболеваний, а также прогнозировать течение и эффективность терапии остается одной из приоритетных задач современной медицины. Проводится множество медико-биологических исследований, указывающих на потенциальную возможность использования в качестве биомаркеров молекул miRNA. miRNA – некодирующие RNA длиной 17-25 нуклеотидов, выявлены у многих видов организмов. Показано, что молекулы miRNA экспрессируются в различных тканях и типах клеток. Изменения в регуляции экспрессии miRNA оказывает значительное влияние на нормальные и патологические процессы организмов. Изменение уровня экспрессии miRNA обнаружено в тканях и сыворотке крови пациентов с различными формами заболеваний. miRNA высокостабильны в сыворотке и плазме, устойчивы к эндогенным рибонуклеазам и неблагоприятным физическим условиям, что позволяет эффективно выделять эти молекулы из биологических жидкостей, их количество может быть измерено с высокой чувствительностью и специфичностью с помощью ПЦР в реальном времени. К настоящему времени выявлены количественные изменения определенных циркулирующих miRNA для ряда заболеваний и дальнейший поиск маркерных miRNA является актуальным направлением медицинской биотехнологии.

Публикаций, посвященных обнаружению и изучению сайтов связывания miRNA в белок кодирующей области mRNA немного. Хотя хорошо известно, что последовательность CDS (белок-кодирующая область mRNA) более консервативна, чем 5'UTR (5'-нетранслируемая область) и 3'UTR (3'-нетранслируемая область) mRNA. Поэтому, вероятно, что через сайты связывания в CDS установлена эволюционно стойкая связь регуляции экспрессии генов посредством miRNA. В связи с вышеизложенным, изучение структурно-функциональной организации сайтов связывания miRNA в CDS mRNA является актуальным.

**Цель работы:** выявить структурно-функциональные свойства сайтов связывания miRNA в белок кодирующей области mRNA генов, связанных с некоторыми социально значимыми заболеваниями.

**Задачи исследования:**

1. Создать базы данных генов, участвующих в развитии болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда и немелкоклеточного рака легкого.
2. Установить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, связанных с развитием болезни Альцгеймера.
3. Установить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, связанных с развитием немелкоклеточного рака легкого.
4. Установить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, связанных с развитием инфаркта миокарда.

5. Изучить взаимодействие miR-1322 с генами, участвующими в некоторых социально значимых заболеваниях
6. Изучить особенности полностью комплементарного взаимодействия miRNA с кодирующей областью mRNA генов.

**Объекты исследования:** нуклеотидные последовательности 6272 miRNA и генов, связанных с развитием некоторых нейродегенеративных, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

**Предмет исследования:** характеристики взаимодействий miRNA с нуклеотидной последовательностью кодирующей области mRNA генов, участвующих в развитии болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда и немелкоклеточного рака легкого.

**Методы исследования.** Методы компьютерного анализа и поиска сайтов связывания miRNA в mRNA генов на основе моделирования водородных связей с помощью программы MiRTarget.

**Научная новизна исследования**. Впервые установлены количественные характеристики взаимодействия miRNA с CDS mRNA генов, связанных с развитием инфаркта миокарда, болезни Альцгеймера, немелкоклеточного рака легкого. Предложены ассоциации miRNA и их генов-мишеней для разработки основ диагностики некоторых онкологических, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. Найдены сайты связывания miRNA в mRNA с величиной свободной энергии взаимодействия равной или более -125 кДж/моль и сайты связывания с кластерной организацией. Выявлены полностью комплементарные взаимодействия miRNA с кодирующей областью mRNA генов, участвующих в развитии этих социально значимых заболеваний. Сайты связывания этих miRNA консервативны в mRNA ортологичных генов.

**Теоретическая значимость работы.** Установлены нуклеотидные последовательности miRNA и mRNA генов человека и их ортологов, связанных с развитием инфаркта миокарда, болезни Альцгеймера и немелкоклеточного рака легкого. Выявлены miRNA, способные связываться с CDS mRNA генов, вовлеченных в развитие этих заболеваний. Установлены сайты связывания miRNA, расположенные с наложением нуклеотидных последовательностей в mRNA многих генов (кластеры). На основании характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов-мишеней предложены ассоциации, участвующие в патогенезе инфаркта миокарда, болезни Альцгеймера, немелкоклеточного рака легкого. Выявлена эволюционная консервативность полностью комплементарных сайтов связывания miRNA, что свидетельствует о раннем возникновении регуляции экспрессии генов молекулами miRNA. Полученные результаты сравнительного анализа сайтов связывания miRNA в mRNA ортологичных генов дают обоснование для подбора экспериментальной модели животного для подтверждения регуляции исследуемых генов-мишеней посредством miRNA в эксперименте.

**Практическая ценность исследования** Выявленные сайты связывания miRNA в CDS mRNA предлагаются для дальнейшей экспериментальной валидации ассоциаций miRNA и генов-мишеней инфаркта миокарда, болезни

Альцгеймера и немелкоклеточного рака легкого. Полученные результаты были переведены на казахский язык и внедрены в учебный процесс и используются при преподавании элективного курса «Геномика және протеомика негіздері» у групп бакалавриата 3 курса специальности 5В060700 «Биология» (Приложение А).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

Белок-кодирующие последовательности mRNA 122 изученных нами генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, болезни Альцгеймера и немелкоклеточного рака легкого являются мишенями miRNA.

В CDS mRNA генов, участвующих в развитии социально значимых заболеваний, имеются одиночные, множественные и полисайты связывания miRNA.

Кластерная организация сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов изученных заболеваний приводит к компактизации нуклеотидной последовательности mRNA, являющейся мишенью нескольких miRNA и возникновению конкуренции молекул miRNA за связывание с геном-мишенью.

Из 17508 изученных генов человека 32 имеют полностью комплементарные сайты связывания miRNA в CDS mRNA. Ассоциации miRNA и mRNA этих генов филогенетически консервативны.

**Основные результаты исследований и выводы:**

1. В формате для программы MirTarget создана база нуклеотидных последовательностей 6272 miRNA человека, содержащая 2565 последовательности из базы данных miRBase и 3707 последовательностей, открытых Londin и др, 2015. Создана база нуклеотидных последовательностей 75 генов, участвующих в болезни Альцгеймера, 237 генов, ассоциированных с инфарктом миокарда и 115 генов, вовлеченные в патогенез немелкоклеточного рака легкого.

2. Определены характеристики взаимодействия 6272 miRNA и 115 генов, участвуюших в развитии немелкоклеточного рака легкого, из которых 64 в CDS mRNA имеют сайты связывания miRNA. Из них установлены ассоциации 40 miRNA и 15 генов-мишеней, свободная энергия взаимодействия которых составляет - 125 кДж/моль и выше.

3. Установлены 23 гена, участвующие в развитии инфаркта миокарда и имеющие сайты связывания miRNA в CDS mRNA. Из них только одна miRNA и одна mRNA взаимодействует с высоким значением свободной энергии равной - 134 кДж/моль.

4. Из изученных 75 генов, участвующих в развитии болезни Альцгеймера выявлены 35 генов, которые имеют сайты связывания miRNA в CDS mRNA. Из них ассоциации 11 miRNA и 8 mRNA имеют свободную энергию взаимодействия равную - 125 кДж/моль и выше.

5. Выявлено изменение числа сайтов связывания miR-1322 в CDS mRNA ортологичных генов животных. miR-1322 может участвовать в регуляции экспрессии кандидатных генов некоторых нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

6. Из изученных 17508 mRNA генов человека найдены 32 гена с полностью комплементарными сайтами связывания 41 miRNA из изученных 2565 miRNA в CDS, для которых выявлена филогенетическая консервативность.

Все поставленные в диссертации задачи выполнены.

Один ген может являться мишенью многих miRNA, и одна miRNA может связываться с несколькими альтернативными генами. Поэтому использование показателя уровня экспрессии одной miRNA или одного гена в качестве маркеров для диагностики крайне затруднительно. Для того, чтобы добиться большей адекватности проведения молекулярной диагностики заболеваний, стоит учитывать влияние miRNA на экспрессию альтернативных генов-мишеней. На основании проведенного анализа предлагается изучать экспрессию ассоциаций одной miRNA с геном-мишенью и высоким значением энергии взаимодействия; ассоциации одного гена-мишени с несколькими miRNA с сайтами связывания с кластерной организацией; ассоциации одной miRNA и нескольких ее генов-мишеней.

Идея использования специфичных комбинаций miRNA наряду со стандартными лабораторными исследованиями направлена на разработку ранних методов диагностики, повышение точности постановки диагноза, а также подбор и мониторинг эффективности проводимой терапии. Использование выявленных ассоциаций miRNA–mRNA, расширит понимание механизмов регуляции экспрессии отдельных генов, вовлеченных в развитие болезни Альцгеймера, немелкоклеточного рака легкого и инфаркта миокарда на посттранскипционном уровне.

**Связь с планом основных научных работ.** Диссертационная работа выполнена в рамках проектов «Разработка метода ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний на основе microRNA и их генов-мишеней» № 0115РК00286, «Разработка тест-систем ранней диагностики сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний на основе ассоциаций miRNA и их генов-мишеней» № 0118РК00034 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены:

– на IX Международном конгрессе «Biotechnology: state of the art and perspectives», Москва, Россия, 2017 г.;

– на IV Международной научной конференции студентов и молодых учёных «Фараби әлемі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан, 2017 г.;

– на Международородной конференции «Clinical proteomics. postgenome medicine», Россия, Москва, 2017 г.;

– на Международном форуме «Biotechnology: state of the art and perspectives», Москва, Россия, 2018 г.;

– на V Международной научной конференции студентов и молодых учёных «Фараби әлемі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан, 2018 г.;

– на V Международной конференции «Molecular phylogenetics and biodiversity biobanking», Москва, Россия, 2018 г.;

– на Международной конференции «Modern molecular-biochemical markers in clinical and experimental medicine», Прага, Чехия, 2018;

– на Международном конгрессе «Biotechnology: state of the art and perspectives», Москва, Россия, 2019 г.;

– на Международном симпозиуме «Cell Symposium on Regulatory RNAs» - Берлин, Германия, 2019 г.;

– на VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Севастополь, Россия, 2019 г.;

– на Международной конференции «New research: problems and prospects", Прага, Чехия, 2019 г.;

– на Международной конференции «Modern science: problems, ideas, trends», г. София, Болгария, 2019 г.;

– на Международном симпозиуме «EMBO|EMBL Symposium: The Non-Coding Genome», Гейдельберг, Германия, 2019 г.

**Публикации и личный вклад автора.** Основное содержание диссертации отражено в 19 печатных работах, в том числе 1 статья в международном журнале с импакт-фактором, цитируемом в Scopus и Web of Knowledge; 5 статей из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки; 14 тезисов в материалах международных конференций, из которых 9 зарубежные.

Автор самостоятельно провёл анализ литературных данных по теме исследования, экспериментальные исследования, анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации.

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 123 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка использованных источников из 178 наименований; содержит 44 таблицы, три рисунка и четыре приложения.