

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)

по специальности «6D060700-Биология»

Белкожаева Аяза Маратовича

на тему: «Взаимодействие микроРНК с мРНК генов, имеющих нуклеотидные повторы»

Общая характеристика работы

Диссертационная работа направлена изучению взаимодействия микроРНК и некоторых пиРНК с мРНК генов, имеющих нуклеотидные повторы, и поиску новых эффективных ассоциаций. Кроме того, предназначен для разработки профилей экспрессии микроРНК в модели клеточной линии человека в качестве диагностического биомаркера тринуклеотидных заболеваний.

Актуальность темы исследования

Экспансия (чрезмерное увеличение числа) последовательностей нуклеотидных повторов в геноме человека может привести к развитию некоторых заболеваний, прежде всего к нарушениям функционирования нервной системы. Увеличение количества повторов нуклеотидов приводит к изменению функции белка и его токсическому накоплению, что приводит к нейродегенеративным заболеваниям. К примеру, болезнь Гентингтона вызывается увеличением числа тринуклеотидных повторов цитозин-аденин-гуанин (CAG) в гене *HTT*. Это приводит к образованию полиглутаминовой цепи на N-конце мутантного белка гентингтина. Кроме того, установлено, что ряд патологических процессов нейродегенеративного характера опосредованы дисрегуляцией некоторых микроРНК. Нейродегенеративные заболевания, вызванные экспансией нуклеотидных (особенно тринуклеотидных) повторов, характеризуются ухудшением памяти и деменцией, что приводит к инвалидизации пациентов и преждевременной смерти.

Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения, около миллиарда человек во всем мире страдают от нейродегенеративных заболеваний. На сегодняшний день умственная отсталость, миотоническая дистрофия, спиноцеребеллярная атаксия, болезнь двигательного нейрона, деменция, хорея Гентингтона и др. являются актуальной научной и медицинской проблемой, так как до сегодняшнего дня не существует способов ранней диагностики и эффективных методов лечения данных заболеваний. В последние годы проведено множество научных исследований, которые показывают возможность использования молекул микроРНК и пиРНК в качестве потенциальных биомаркеров нейродегенеративных заболеваний, вызванных экспансией нуклеотидных повторов.

МикроРНК и пиРНК представляют собой короткие некодирующие молекулы РНК (длиной 17–25 и 24–32 нуклеотидов, соответственно), которые играют важную роль в посттранскрипционной регуляции генов. МикроРНК интенсивно экспрессируются в мозге, поэтому эти молекулы считаются ключевыми регуляторами развития и пластичности нейронов. ПиРНК играют важную роль в развитии зародышевой линии, эпигенетических модификаций и поддержании целостности генома, но новые исследования показывают, что они могут играть важную роль в нейродегенеративных расстройствах. Молекулы микроРНК и пиРНК сайты связывания, которых находятся на повторяющихся последовательностях генов-мишеней, могут быть вовлечены в регуляцию экспансии повторов и связанных с ними патогенных механизмов, однако точные механизмы до сегодняшнего дня остаются малоизученными.

На сегодняшний день не существует базы микроРНК и пиРНК и ассоциированных с ними генов-мишеней с нуклеотидными повторами. Кроме того, экспрессия микроРНК при нейродегенеративных заболеваниях, вызванных экспансией нуклеотидных повторов, изучена

недостаточно. В связи с этим, определение взаимодействий между микроРНК, пиРНК и мРНК генов с экспансией нуклеотидных повторов, а также изучение экспрессии данных молекул в норме и при патологиях нервной системы является актуальным и перспективным направлением исследований патогенеза нейродегенеративных заболеваний.

Цель исследования: изучить связывание микроРНК, а также некоторых пиРНК с нуклеотидными повторами в мРНК генов-мишеней и уровень экспрессии микроРНК и их генов-мишеней в модельной клеточной линии человека.

Задачи исследования:

1. Определить особенности взаимодействия микроРНК с тринуклеотидными повторами мРНК генов в области CDS;
2. Определить особенности взаимодействия микроРНК с три и динуклеотидными повторами мРНК генов в областях UTR;
3. Определить особенности взаимодействия пиРНК с тринуклеотидными повторами мРНК генов в области CDS и UTR;
4. Получить модельную клеточную линию при болезни Гентингтона для изучения экспрессии микроРНК и их генов-мишеней;
5. Изучить агрегацию белка Htt в норме и патологии в полученных модельных клеточных линиях;
6. Определить экспрессию микроРНК в норме и патологии в полученных модельных клеточных линиях;
7. Определить экспрессию генов-мишеней дифференциально экспрессированных микроРНК в норме и патологии в полученных модельных клеточных линиях.

Объекты исследования: нуклеотидные последовательности микроРНК, пиРНК и мРНК генов человека; клетки SH-SY5Y (клеточная линия нейробластомы); клеточные линии HTT-Q23 и HTT-Q74.

Предмет исследования: характеристика взаимодействия микроРНК и пиРНК с нуклеотидными повторами в мРНК генов-мишеней и экспрессия микроРНК и их генов-мишеней в модельной клеточной линии человека.

Методы исследования: методы *in silico*, культивирование клеток, трансформация, трансфекция, Вестерн- и дот-блоттинг, иммунофлуоресцентный анализ, анализ полного транскриптома miRNA HTG EdgeSeq, пакет статистического анализа HTG EdgeSeq Reveal, количественная ПЦР.

Научная новизна исследования

В ходе исследования впервые установлены ассоциации микроРНК и некоторых пиРНК с мРНК генов, ответственных за развитие болезней нуклеотидных повторов, с сайтами связывания в участках 5'UTR, CDS и 3'UTR.

В нашем исследовании представлен новый подход к моделированию болезни Гентингтона *in vitro* путем трансфекции плазмид рEGFP-Q23 и -Q74 в клеточную линию человека SH-SY5Y.

Выявлена дифференциальная экспрессия 354 микроРНК между нормой и болезнью Гентингтона в модельных клеточных линиях HTT-Q23 и HTT-Q74.

С помощью компьютерной программы для 354 дифференциально экспрессируемых микроРНК определены 18 генов-мишеней, ответственных за развитие нейродегенеративных заболеваний.

Методом количественной ПЦР для 7 из этих генов выявлена дифференциальная экспрессия между нормой и болезнью Гентингтона в модельных клеточных линиях HTT-Q23 и HTT-Q74.

Теоретическая значимость работы

В диссертации охарактеризованы ассоциации микроРНК и пиРНК с нуклеотидными повторами в мРНК генов, ответственных за развитие нейродегенеративных заболеваний. Изучены

профили экспрессии микроРНК и их генов-мишеней в модельных клеточных линиях НТТ-Q23 (норма) и НТТ-Q74 (болезнь Гентингтона). Полученные данные дополняют теоретические знания в данной области. Результаты работы проливают свет на молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний, вызванных экспансией нуклеотидных повторов.

Практическая ценность исследования

Полученные знания могут послужить основой для разработки новых способов профилактики, ранней диагностики и альтернативных методов лечения нейродегенеративных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Показано, что микроРНК и пиРНК могут регулировать экспрессию генов, ответственных за заболевания, связанные с экспансией нуклеотидных повторов, путем ассоциации с тринуклеотидными повторами в 5'UTR, CDS, 3'UTR областях, и с динуклеотидными повторами в 3'UTR области;
- Показано, что плазмиды pEGFP-Q23 и -Q74 стабильно трансфицируются в клеточную линию SH-SY5Y человека;
- Белок Q74-Htt более склонен к агрегации, чем Q23-Htt. Агрегаты Q74-Htt располагаются ближе к ядру, тогда как белок Q23-Htt равномерно распределен в цитоплазме;
- Установлено, что 354 микроРНК были дифференциально экспрессированы между клеточными линиями НТТ-Q23 и НТТ-Q74. Для большинства из них отмечено понижение экспрессии в клетках модели болезни Гентингтона;
- С помощью компьютерного анализа установлено, что среди 354 дифференциально экспрессированных микроРНК 9 микроРНК (miR-3687, miR-612, miR-4417, miR-4261, miR-504-3p, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p и miR-22-5p) имеют сайты связывания в областях 5'UTR, CDS и 3'UTR мРНК 18 генов, играющих важную роль в нейродегенеративных заболеваниях;
- С помощью количественной ПЦР установлено, что среди этих 18 генов, 7 генов (*ATN1*, *GEMIN4*, *EFNA5*, *CSMD2*, *CREBBP*, *ATXN1* и *B3GNT2*) дифференциально экспрессируются в модельной клеточной линии болезни Гентингтона НТТ-Q74.

Основные результаты исследований и выводы

1. miR-1273f, miR-1322, miR-1181, miR-4258, miR-1281, miR-6833-5p, miR-877-3p, miR-3960, miR-4458, miR-1910-5p, miR-4302, miR-1260a, miR-8083 и miR-1908-3p имеют сайты связывания в области CDS с тринуклеотидными повторами (ACC, CAG, CGG, CCG, AGG, UCC, CCC) мРНК 36 генов, ответственных за развитие нейродегенеративных заболеваний, с высокими значениями свободной энергии связывания (-84 кДж/моль и выше).

2. miR-4258, miR-3960, miR-211-3p и miR-3155b имеют сайты связывания в областях 5'-UTR и 3'-UTR с тринуклеотидными повторами CGG, GCC и CUG мРНК 34 генов, ответственных за развитие нейродегенеративных заболеваний, с высокими значениями свободной энергии связывания (-87 кДж/моль и выше). Среди микроРНК, открытых *Londin* и соав., ID00372.5p-miR, ID01508.5p-miR, ID00296.3p-miR, ID01702.3p-miR и ID00522.5p-miR имеют сайты связывания в областях с CAG, CGG и CUG тринуклеотидными повторами мРНК генов *ATXN2*, *FMN2*, *MN1*, *ADRBK1*, *BRSK2*, *C11orf87*, *FMRI*, *BLMH* и *DMPK*, с высокими значениями свободной энергии связывания (-121 кДж/моль и выше). Кроме того, miR-466, ID00436.3p-miR, miR-574-5p и ID00470.5p-miR имеют сайты связывания в областях с динуклеотидными повторами GU и AC мРНК генов, ответственных за развитие нейродегенеративных (15 генов), онкологических (18 генов) и диабетических заболеваний (9 генов).

3. piR-32860, piR-28515 и piR-65782 имеют сайты связывания в CDS областях с CAG, CGG и GCC тринуклеотидными повторами мРНК генов *AR*, *ATN1*, *CASKIN1*, *DLX6*, *DMRTA2*, *E2F4*, *FOXE1*, *FOXF2*, *HTT*, *IRF2BPL*, *MAML3*, *MNX1*, *NKX2*, *RAI1*, *SMARCA2*, *TBP*, *ZIC5*, *ZNF384*, *ZNF703* и *ZSWIM6*, в 5'UTR *BCL11A*, *BCL2L1*, *GLS*, *GNB2*, *KIF3B*, *MAB21L1*, *NDRG3*, *SBF1*, *SMAD9* и *WBP4*, с высокими значениями свободной энергии связывания (-118 кДж/моль и выше).

4. Плазмиды pEGFP-Q23 и -Q74 стабильно трансфицируются в клеточную линию SH-SY5Y человека. В результате трансфекции получены модельные клеточные линии болезни Гентингтона и нормы.

5. Белок Q74-Htt более склонен к агрегации, чем Q23. Агрегаты Q74-Htt располагались ближе к ядру, тогда как белок Q23-Htt более равномерно распределен в цитоплазме.

6. 354 микроРНК дифференцированно экспрессированы между клеточными линиями НТТ-Q23 и НТТ-Q74 ($p < 0.05$). Экспрессия 126 микроРНК достоверно повышалась и 228 микроРНК достоверно понижалась в клетках модели болезни Гентингтона по сравнению с контролем.

7. Среди 354 дифференциально экспрессированных микроРНК в клеточной линии болезни Гентингтона 9 микроРНК (miR-3687, miR-612, miR-4417, miR-4261, miR-504-3p, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p и miR-22-5p) имеют сайты связывания в областях 5'UTR, CDS и 3'UTR мРНК 18 генов, играющих важную роль в нейродегенеративных заболеваниях. Среди 18 генов-мишеней, 7 генов дифференциально экспрессировались в модельной клеточной линии болезни Гентингтона НТТ-Q74 (гены *ATN1*, *EFNA5*, *CREBBP* со значениями $p < 0.05$ и гены *GEMIN4*, *CSMD2*, *ATXN1*, *B3GNT2* со значениями $p < 0.01$).

Выявленные в данной работе ассоциации микроРНК и пиРНК с генами-мишенями могут играть важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Дальнейшие исследования должны подтвердить обнаруженные функциональные связи, обнаружив механизмы патологических процессов, что послужит основой для разработки новых диагностических стратегий и альтернативных методов терапии.

Дифференциально экспрессированные в модельных клеточных линиях микроРНК могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры (ранней диагностики, прогностики, мониторинга лечения и др.) болезни Гентингтона, а также других нейродегенеративных заболеваний. Для разработки таких биомаркеров необходимы дальнейшие исследования в кагортах пациентов и здоровых контролей.

Связь с планом основных научных работ

Диссертационная работа выполнена в рамках проекта «Разработка тест-систем ранней диагностики сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний на основе ассоциаций miRNA и их генов-мишеней» № AP05132460 Министерство науки и высшего образования Республики Казахстан (2018–2020 гг.). Экспериментальная часть научно-исследовательской работы проводилась в рамках научной стажировки в лаборатории наук о жизни (Life Sciences Laboratory), г. Сануидж, Великобритания (2020-2023 гг.).

Апробация работы: Материалы диссертации были представлены и обсуждены на следующих научных конференциях:

1. Международной научной конференции «Prospects for the development of biology, medicine and pharmacy» (Шымкент, Казахстан, 07-08 декабря 2018 г.);

2. Международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ЭЛЕМІ» (Алматы, Казахстан, 2019-2022 гг.);

3. Международной научной конференции «Biotechnology: state of the art and perspectives» (Москва, Россия, 25-27 февраля 2019 г.);

4. Международной научной конференции «Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB)» (Москва, Россия, 27-30 июля 2019 г.);

5. Международной научной конференции «Biotechnology: Science and Practice» (Севастополь, Россия, 16-20 сентября 2019 г.);

6. Международной научной конференции «Fundamental research and innovations in molecular biology, biotechnology, biochemistry» (Алматы, Казахстан, 28-29 ноября 2019);

7. Международной научной конференции «Innovations in life sciences: collection of materials of the II International Symposium» (Белгород, Россия, 19-20 мая 2020 г.);

8. Международной научной конференции «1st Central Asia Genomics Symposium» (Ташкент, Узбекистан, 09-10 декабря 2021 г.);

9. Международной научной конференции «UK Society for Extracellular Vesicles» (Эдинбург, Шотландия, 01-02 декабря 2022 г.);

10. Международной научной конференции «Asfen. Forum, new generation-2023» (Алматы, Казахстан, 05-06 июня 2023 г.).

11. Международная конференция молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в области молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии», посвященная 40-летию со дня основания Института молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина (Алматы, Казахстан, 17 ноября 2023 г.).

Публикации: По результатам диссертации опубликованы 20 печатных работ, в том числе 3 статьи в международных журналах с ненулевым импакт-фактором, цитируемых в Scopus и Web of Knowledge; 3 статьи из перечня Комитета по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования; 14 тезисов в материалах международных конференций.

Личный вклад автора: Проведение экспериментов по теме исследования, анализ результатов и написание диссертации выполнялись при личном участии автора.

Структура диссертации: Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и список использованных источников из 345 наименований; содержит 31 таблиц, 21 рисунков.