

МикроРНК, ЭВОЛЮЦИЯ И РАК

© Н. Н. Колесников,¹ * С. Е. Титов,^{1,2} Ю. А. Веряскина,¹ Е. В. Карпинская,³
С. П. Шевченко,³ Л. Г. Ахмерова,¹ М. К. Иванов,² В. В. Козлов,⁴
Е. А. Елисафенко,⁵ Л. Ф. Гуляева,⁶ И. Ф. Жимулев¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск,

² ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово, Новосибирская обл.,

³ Новосибирская городская клиническая больница № 1,

⁴ Новосибирский областной онкологический диспансер, ⁵ Институт цитологии и генетики СО РАН
и ⁶ Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, Новосибирск;

* электронный адрес: kolesnikovnn@mcb.nsc.ru

МикроРНК (миРНК) известны как посттранскрипционные негативные регуляторы экспрессии генов, связывающиеся с 3'-нетранслируемой областью мРНК-мишени в цитоплазме. Более 1600 микроРНК экспрессируется в клетках человека, участвуя в регуляции эмбрионального развития, дифференцировки, клеточного цикла, апоптоза, старения, определяя, таким образом, судьбу клетки. До 60 % генов, кодирующих белок млекопитающих, находятся под контролем миРНК. Различающиеся спектры миРНК выявлены в разных тканях человека в норме и при различных патологиях, включая онкологические заболевания, что позволяет предположить их участие в большинстве клеточных процессов. На сегодняшний день не вызывает сомнений, что регуляторный потенциал генома во многом определяется миРНК. В связи с этим в нашем исследовании был проведен сравнительный филогенетический анализ происхождения и эволюции 1048 миРНК генома человека, исследована роль ключевых молекул миРНК в онкогенезе щитовидной и молочной желез человека, потенциальных диагностических маркеров злокачественных новообразований. Анализ филогенетического распределения генов миРНК в геноме выявил 4 пика появления новых генов миРНК в эволюции от многоклеточных до человека. Наибольшее число новых генов миРНК появилось после дивергенции человека от общего предка с шимпанзе. Экспансия мобильных элементов в геном сопровождалась возникновением на основе их последовательностей генов миРНК, при этом более 14 % из 1600 генов миРНК человека произошли из транспозонов и сохранились до сегодняшнего времени. Наши результаты показали, что 5 онко-микроРНК — миРНК-21, -221, -222, -155 и -205 — дифференциально экспрессируются в злокачественных опухолях щитовидной и молочной желез. Профили экспрессии миРНК — miR-221, -222, -155 и -205 — различаются между этими типами рака, а миРНК-21 в обоих случаях повышена в 10 раз. Полученные данные позволяют предположить различные механизмы участия одних и тех же миРНК в процессах онкогенеза этих органов, а профили экспрессии исследуемых миРНК могут быть использованы в диагностике и прогнозе рака молочной и щитовидной желез.

Ключевые слова: микроРНК, рак, эволюция, транспозоны, биомаркеры.

Принятые сокращения: миРНК — микроРНК, 3'UTR — нетранслируемая область гена, РМЖ — рак молочной железы, РЩЖ — рак щитовидной железы.

За несколько последних лет сформировалось новое направление исследований механизмов онкогенеза у человека, связанное с миРНК. МиРНК — это класс малых некодирующих регуляторных РНК длиной 20—24 нуклеотида, участвующих в регуляции экспрессии, кодирующих белок генов, на посттранскрипционном уровне. МиРНК являются интегральными компонентами геномов животных, растений и вирусов. В геноме человека в настоящее время выявлено 1600 генов миРНК и 2042 зрелых последовательностей, аннотированных в базе данных (Rel.19, <http://mirbase.org/>). Гены миРНК локализованы в межгенных участках, в составе интронов и экзонов генов, кодирующих белок, в составе длинных некодирующих генов РНК (Колесников, Елисафенко, 2010). Гены

миРНК на первом этапе транскрибируются в качестве первичных предшественников при-миРНК (pri-miRNAs), далее подвергаются процессингу, в ходе которого образуется пре-миРНК (pre-miRNAs) длиной около 100 п. н. Из этих предшественников и возникает зрелая форма миРНК (mature miRNAs) приблизительно в 22 нуклеотида. Зрелая миРНК связывается с комплементарными участками 3'UTR-районов генов-мишеней, приводя либо к расщеплению мРНК гена-мишени, либо к подавлению трансляции, и, таким образом, осуществляет свою функцию негативного регулятора генов на посттранскрипционном уровне (Bartel, 2004).

Значение миРНК в регуляторном потенциале генома чрезвычайно велико. Они участвуют практически во всех

базовых процессах от момента возникновения организма. Многочисленные данные, накопленные к настоящему моменту, однозначно свидетельствуют об их критической роли в ключевых процессах метаболизма, эмбрионального развития, пролиферации, дифференцировки, старения, иммунном и стрессовом ответах, геномном импринтинге, а также при разных патологиях, включая рак (Lee, Dutta, 2009). МиРНК выполняют множественную роль не только как посттрансляционные негативные регуляторы, а возможно, и как активаторы транскрипции и трансляции (Hansen et al., 2011). В настоящее время более 21 000 генов миРНК аннотировано в геномах 193 видов представителей многоклеточных организмов Metazoa, а также вирусов (Rel.19, <http://mirbase.org/>). За миллионы лет эволюции сформировалась регуляторная сеть миРНК с точно отлаженным механизмом взаимодействия миРНК с мРНК гена мишени. Полагают, что более 60 % генов генома человека негативно регулируются этими РНК (Friedman et al., 2009). Причем 1 миРНК может регулировать экспрессию от 10 до 200 генов, а в свою очередь 1 ген может быть под контролем десятка разных миРНК. Соответственно миРНК являются глобальными переключателями генома, координированно регулируя множественные метаболические пути и образование белковых продуктов. Таким образом, миРНК тесно связаны с нормальными процессами в клетке и представляют собой «темную часть» регуляторного потенциала генома, которая только теперь стала доступной исследователям.

Поскольку регуляция с участием миРНК необходима для нормального развития и функционирования и отдельной клетки, и многоклеточного организма как единого целого, закономерно, что дерегуляция экспрессии генов, кодирующих миРНК, может приводить к различным патологическим процессам, включая нарушения развития и злокачественные новообразования. Многочисленными исследованиями последнего десятилетия показано участие миРНК в механизмах онкогенеза у человека (Krutovskikh, Herceg, 2010).

МиРНК дифференциально экспрессируются в разных типах раковых клеток по сравнению с клетками нормальных тканей, их уровень экспрессии может либо значительно повышаться, либо снижаться, что позволило высказать предположение об их причинной роли в возникновении опухолей и их развитии, а сами миРНК рассматривать в качестве онкогенов или онкосупрессоров в зависимости от генов-мишеней, которые они регулируют (Esquela-Kerscher, Slack, 2006). Более того, миРНК, ассоциированные с разными гистотипами опухолей или стадиями развития, могут служить в качестве соответствующих молекулярных биомаркеров в диагностике и прогнозе течения заболевания, а также быть потенциальными терапевтическими мишенями. Экспериментальные работы по этому направлению интенсивно развиваются, интерес и надежды практической медицины за рубежом к этим исследованиям велики. В связи с этим большой интерес представляет дальнейшее исследование роли миРНК в процессах канцерогенеза человека с целью выявления ключевых молекул, потенциальных маркеров злокачественных новообразований для диагностических и прогностических целей.

Первоочередная задача нашего исследования заключалась в проведении сравнительного анализа происхождения и эволюции генов миРНК генома человека, а также оценке вклада транспозонов в их происхождение. На сле-

дующем этапе определяли уровень экспрессии отдельных онко-миРНК в норме и при злокачественных образованиях в щитовидной и молочной железах. Результаты первой части исследования могут быть кратко суммированы в следующем виде.

Распределение в геноме по хромосомам. В базе данных miRBase на август 2012 г. (выпуск 19) аннотировано 1600 последовательностей генов миРНК в геноме человека. Суммарная длина всех последовательностей составляет всего 133.6 т. п. о., содержание GC — 49.98 %, выше среднего по геному (41 %), т. е. гены миРНК локализованы, по-видимому, в GC-богатых областях генома человека, для которых характерна репликация в начале клеточного цикла. Гены миРНК занимают мизерную часть генома, в 1000 раз меньше (0.004 %), чем экзоны кодирующих белок генов (2 %). Наибольшее число генов миРНК локализовано в 3 хромосомах, составляющих 10 % генома: в хромосоме 1 — 135, в хромосоме 19 — 111 и в X-хромосоме — 113 миРНК, что составляет около 30 % всех локализованных миРНК. Наименьшее число миРНК — в хромосомах 21 и Y (19 и 2 соответственно). Распределение и плотность миРНК в геноме человека, скорее всего, носят неслучайный характер, не зависят от длины хромосом, плотности и числа генов, кодирующих белок. Так, в хромосоме 22 выявлено в 2 раза больше генов миРНК (38), чем в хромосоме 21, которая содержит наименьшее число среди аутосом как генов, кодирующих белок, так и генов миРНК. В хромосоме 19 с самой большой плотностью кодирующих белок генов в геноме человека число генов миРНК сравнимо с числом в самой длинной хромосоме 1-й и в 8-й по размеру X-хромосоме. Средняя плотность распределения миРНК в геноме человека составляет 0.54 на 1 Mb, наибольшая (1.8/Mb) — в хромосоме 19 и наименьшая (0.39/Mb) — в хромосоме 21. В X-хромосоме на 1 Mb приходится 0.72 гена миРНК.

МиРНК и мобильные элементы. Для оценки вклада мобильных элементов в происхождение генов миРНК мы провели сравнительный анализ всего пула последовательностей 1600 генов миРНК против всех последовательностей повторов приматов, содержащихся в последней версии базы данных RepBase (версия 20110920), с помощью программы RepeatMasker (версия 3.2.9). Такой же анализ был выполнен нами для мыши, только сравнительно с базой данных повторов для грызунов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 14 % генов миРНК имеют достоверно значимую гомологию с разными классами повторяющихся последовательностей в геноме человека, т. е. произошли из мобильных элементов и простых повторов. В геноме мыши к настоящему времени выявлено 855 генов миРНК (выпуск 19, miRBase), из них 14.4 % произошли из повторов, так же как у человека. Однако вклад разных классов повторов в происхождение генов миРНК оказался разным для этих двух видов. Так, в геноме человека половина (50 %) генов миРНК произошла из ДНК транспозонов — 7 % от общего числа всех миРНК генов. Остальные — в порядке уменьшения: SINEs — 2.55 %, LINEs — 1.8, LTR — 0.78 %. У мыши совсем другая картина — наибольший вклад внесли LTR-элементы эндогенных ретровирусов, на них приходится 5.56 % последовательностей от всех генов миРНК. И далее: SINEs — 2.98 %, LINEs — 1.76, ДНК-элементы — 0.62 %. Отсюда следует важный вывод: мобильные элементы внесли существенный вклад в происхождение миРНК генов и дивергенцию регулятор-

ного потенциала на уровне генов миРНК между этими двумя видами.

Дальнейший сравнительный анализ наборов миРНК генов X-хромосом человека и мыши показал, что только 40 % генов миРНК X-хромосомы являются общими для 2 видов, остальные — специфическими. Часть генов миРНК имеет общее происхождение от позвоночных, но была инактивирована и существует в виде псевдогенов миРНК в геноме мыши. Детальный сравнительный анализ филогенетического распределения 1048 миРНК генов генома человека (выпуск 16, 2010 г.) среди геномов шимпанзе, представителей плацентарных, позвоночных и многоклеточных обнаружил 4 периода эволюционных событий, сопровождавшихся возникновением новых генов: это появление позвоночных. 149 генов миРНК в геноме человека выявлены в геномах *Danio rerio* и *Oryzias latipes*, истинных плацентарных, 169 генов миРНК человека имеют гомологи в геномах мыши, собаки, лошади, коровы и др. У приматов 308 генов миРНК являются общими только для человека и шимпанзе. И наконец, после разделения ветвей, ведущих к человеку и шимпанзе, 380 генов миРНК, 40 % от числа всех проанализированных генов, специфичны только для человека. Видим закономерность — по мере возрастания «сложности» организации растут число регуляторных генов миРНК и их видоспецифичность. Возможно, это и есть один из ответов на парадокс N — на уровне числа кодирующих белок генов разница между далекими видами невелика, а вот различие по количеству регуляторных генов весьма существенно, в то же время некоторые регуляторные гены являются высококонсервативными и общими для эволюционно отдаленных видов.

Онкомир. Вторая часть нашего исследования была связана с выяснением роли миРНК в онкогенезе и оценкой возможностей использования миРНК в качестве диагностических и прогностических маркеров. Онкологические заболевания по-прежнему сохраняют лидирующие позиции и занимают второе место по причине смертности населения во всем мире. Летальность исходов онкологических заболеваний для подавляющего большинства пациентов обусловлена распространением метастазов первичной опухоли. Однако при современном уровне развития медицины почти каждую опухоль можно успешно излечить, вопрос лишь в раннем обнаружении и распознавании злокачественного образования. Поэтому чрезвычайно актуальна проблема создания современных высокоэффективных методов диагностики опухолевых образований, содержащих объективные и надежные количественные методы оценки состояния клетки в норме и при патологии. МиРНК, как показали многочисленные исследования, выполненные к настоящему времени, удовлетворяют этим условиям.

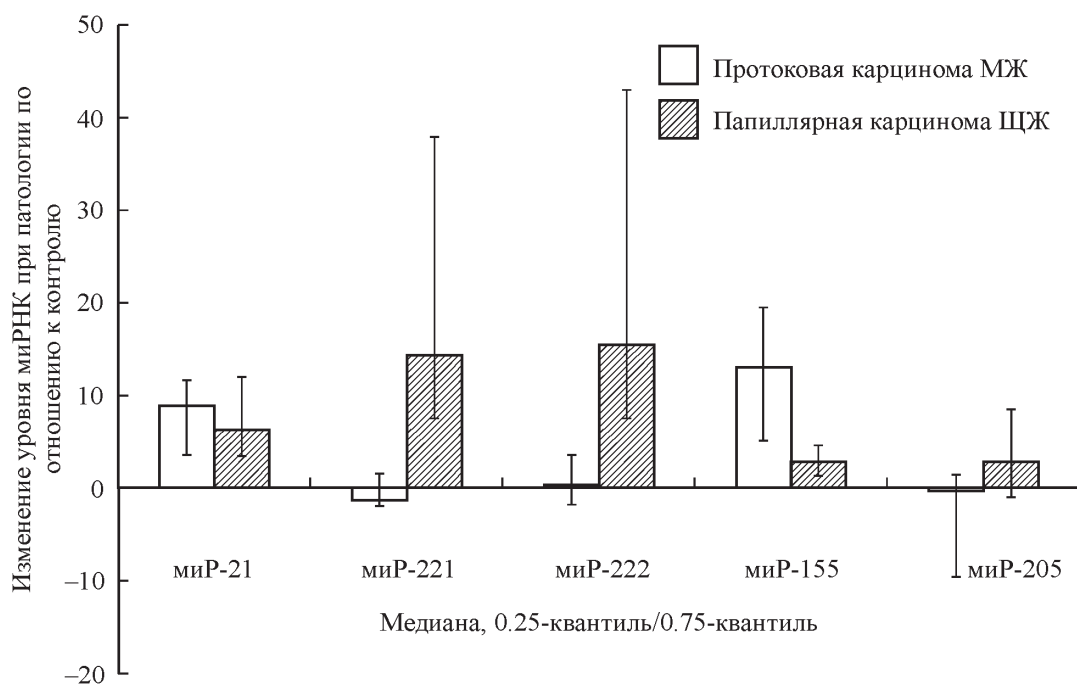
Мы провели анализ уровня экспрессии пяти онко-миРНК в норме и при раке щитовидной и молочной желез человека. Рак щитовидной железы (РЩЖ) является самой частой опухолью эндокринной системы, наиболее распространенной формой является папиллярный РЩЖ, составляющий до 80 % злокачественных новообразований щитовидной железы. Папиллярный РЩЖ — весьма переменная по морфологическим свойствам форма рака: от микрокарцином (30 %) до полного поражения обеих долей и окружающих тканей. Для папиллярного РЩЖ характерно метастазирование в региональные лимфатические узлы шеи (60—70 %) (Кондратьева, 2007). Рак молочной железы (РМЖ) в структуре онкологиче-

ских заболеваний женщин занимает 1-е место (26 % всех случаев рака). Протоковая инвазивная карцинома — фенотипически многообразное заболевание, состоящее из опухолей с варьирующими патологическими и молекулярными характеристиками. В первоначальную задачу исследования входило определение вариаций уровня экспрессии выбранных для анализа миРНК в нормальных и раковых клетках щитовидной и молочной желез.

Клинический материал для анализа был предоставлен Областным онкологическим диспансером и муниципальной городской больницей № 1 г. Новосибирска в соответствии с законодательством РФ. Операционный материал, опухолевые и нормальные ткани были получены от 57 пациентов с различными гистопатологическими типами опухолей: 41 образец папиллярного РЩЖ и 16 образцов протоковой инвазивной карциномы молочной железы. Материал сопровождался официальным заключением врача-гистолога. В работе использовали количественный метод ПЦР-анализа (Chen et al., 2005). МиРНК для исследования были выбраны на основе биоинформационного анализа многочисленных баз данных и данных литературы. Критерием выбора являлись их участие и критическая роль в процессах, характеризующих отличительные черты раковых клеток, таких как избегание апоптоза, неограниченная пролиферация, инвазия и метастазирование, ангиогенез (Hanahan, Weinberg, 2011). На первом этапе проводили анализ 4 миРНК — миРНК-21, миРНК-221, миРНК-222 и миРНК-155, по данным литературы относящихся к онко-миРНК (к тем, сверхэкспрессия которых в раковых клетках нарушает работу генов-супрессоров опухоли), и онкосупрессорной миРНК-205, регуляция которой ведет к активации онкогенов (Esquela-Kerscher, Slack, 2006).

Цель работы заключалась в определении и выявлении различий в экспрессии миРНК в раковых клетках сравнительно с нормальными прилежащими клетками данной ткани одного и того же пациента, а также анализе вариабельности экспрессии одних и тех же онко-миРНК в разных типах рака — РЩЖ и РМЖ.

МиРНК-21. Это одна из первых переоткрытых миРНК (Lagos-Quintana et al., 2001) и наиболее хорошо изученных многофункциональных миРНК. Ген локализуется в межгенной области хромосомы 17q23.1, размер 72 п. н., плюс-цепь, фланкирован белок кодирующим геном 5'-*UMP1* (или *TMEM49*) и геном малой ядерной РНК 3'-*U6*. Ген *TMEM49*, вероятно, является геном-хозяином (host gene) гена *МИР21*, т. е. транскрибируется в составе транскрипта гена-хозяина (Seike et al., 2009). Генное семейство миР-21 относится к высококонсервативным семействам миРНК и включает в себя 29 последовательностей разных видов от человека до представителей рыб (www.mirbase.org/), т. е. появилось не менее 450 млн лет назад. Для миРНК-21 человека предсказано 307 генов-мишеней с консервативными сайтами узнавания в 3'-нетранслируемой области генов (www.targetscan.org/). Транскрипция активируется фактором STAT3 и другими транскрипционными факторами, консервативные последовательности которых выявлены в промоторной области гена (genome.ucsc.edu; ensembl.org). В норме выявлена повсеместная экспрессия миР-21 РНК во многих тканях человека с преобладанием транскрипции в легких, трахее, простате и мочевом пузыре (Sonkoly et al., 2007). Экспрессия миР-21 повышена почти во всех типах раковых опухолей — глиоме, РМЖ, раке желудка, легких и др. На этом основании ген *МИР21* был отнесен к силь-



Изменение уровня экспрессии миРНК в раковых клетках по отношению к условно нормальным клеткам (контроль) в двух опухолях эпителиального происхождения — протоковой инвазивной карциноме молочных желез (МЖ) и папиллярной карциноме щитовидной железы (ЩЖ).

ным онкогенам. Было высказано предположение о том, что повышенная экспрессия *МИР21* вызывает блокирование генов, связанных с апоптозом (Chan et al., 2005). Совокупность многочисленных данных свидетельствует о том, что миРНК-21 участвует в регуляции клеточного цикла, апоптоза, клеточного роста и инвазии, пролиферации, ангиогенезе — практически во всех процессах, которые отличают раковую клетку от нормальной (Krichevsky, Gabriele, 2009; Krutovskikh, Herceg, 2010).

В своих исследованиях мы выявили увеличение уровня экспрессии миРНК-21 как в раковых клетках папиллярной карциномы щитовидной железы, так и при протоковом инвазивном РМЖ по сравнению с прилежащими условно нормальными клетками (см. рисунок и таблицу). На рисунке видно, что значение медианы для миРНК-21 при протоковом инвазивном РМЖ несколько выше, чем значение медианы при папиллярном РЩЖ, однако интер-

квартильный размах практически одинаков. По-видимому, повышение экспрессии миРНК-21 протекает сходным образом при этих двух разных типах рака и ассоциировано с развитием злокачественного новообразования.

МиРНК-221 и миРНК-222. Кластер из двух миРНК локализован в межгенном районе X-хромосомы — Xp11.3, в минус-цепи, на расстоянии 727 п. н. друг от друга. Длина генов по 110 п. н. МиРНК-221 и миРНК-222 объединены в одно высококонсервативное семейство миРНК-221/222/222ab, состоящее из 57 последовательностей разных видов. У человека для этого семейства предсказано 446 кодирующих белок генов-мишеней (www.targetscan.org/). Зрелая миРНК-222-3p (21 н.) отличается от зрелой миРНК-221-3p (23 н.) по трем основаниям (1 делеция/вставка, 2 замены). Возможно, наборы генов-мишеней для этих миРНК могут как перекрываться, так и иметь специфические мишени. Кроме того, эти миРНК могут транскрибироваться независимо друг от друга (база данных genome.ucsc.edu/), хотя и находятся в одном кластере в геноме, а с другой стороны, не исключена их возможная совместная регуляция и транскрипция. Сверхэкспрессия миРНК-221/222 отмечена при РЩЖ, гепатоклеточной карциноме, глиоме и др., что ведет к подавлению онкосупрессорных генов. МиРНК-221/222 относят к онкогенным миРНК, их сверхэкспрессия в разных типах опухолей, включая РЩЖ, приводит к усилению клеточной пролиферации, ингибированию апоптоза, индукции ангиогенеза (Croce, 2009).

При анализе миРНК-221/222 в раковых клетках щитовидной железы мы показали более чем 10-кратное увеличение уровня их экспрессии в сравнении с нормой, тогда как в раковых клетках молочной железы картина их экспрессии кардинально отличается (см. рисунок и таблицу). Подавление и низкий уровень экспрессии миРНК-221/222 в опухолях молочной железы коррелирует с положительным статусом эстрогенного рецептора ER

Статистическая оценка различий между двумя выборками данных (РМЖ относительно РЩЖ) по изменению уровня экспрессии миРНК с использованием U-критерия Манна—Уитни (STATISTICA 9.1)

миРНК	P	Размер выборки	
		РМЖ	РЩЖ
-21	0.978748	16	41
-221	0.000000	16	41
-222	0.000000	16	41
-155	0.000369	16	38
-205	0.00488	16	41

Примечание. РМЖ и РЩЖ — рак молочной (протоковая карцинома) и щитовидной (папиллярная карцинома) желез соответственно. По выделенным параметрам группы достоверно различаются при $P < 0.05$.

и более благоприятным прогнозом течения заболевания, тогда как агрессивные опухоли имеют повышенный уровень экспрессии этих миРНК и отрицательный статус гормонального рецептора (Zhao et al., 2008; Stinson et al., 2011). В нашем случае из 16 образцов протоковой инвазивной карциномы 12 имели ER/PR-положительный гормональный статус и низкий уровень изменения экспрессии миРНК-221/222, которые могут быть использованы в качестве прогностических маркеров.

МиРНК-155. Цитогенетическая локализация гена *MIR155*: 21q21.3, в плюс-цепи, размер — 65 п. н. Филогенетически консервативное семейство, к которому относится ген *MIR155*, насчитывает 18 последовательностей представителей животного царства, включая рыб. Для человека предсказано 440 консервативных мишеней, регулируемых этой миРНК (www.targetscan.org). Первичный транскрипт, содержащий зрелую миРНК-155, входит в состав гена-хозяина *BIC*, представляющего собой не кодирующий РНК ген (Kluiver et al., 2005). Обнаружено, что сверхэкспрессия или понижение экспрессии миРНК-155 происходит как при воспалительных процессах, так и при ответах врожденной и адаптивной иммунной систем, развитии иммунной системы в целом и при злокачественном перерождении. Активность миРНК-155 необходима для поддержания нормальных функций, в норме ген экспрессируется в клетках иммунной и репродуктивной систем, фибробластах, эпителиальных тканях; дерегуляция связана с геномной нестабильностью, вирусными инфекциями; увеличение экспрессии отмечено при иммунном ответе, аутоиммунных заболеваниях, так же как и при различных типах рака (Tili et al., 2011).

Мы выявили повышение уровня экспрессии миРНК-155 при протоковом инвазивном РМЖ в сравнении с папиллярной карциномой щитовидной железы (см. рисунок и таблицу). Медианные значения различаются в 4 раза, а интерквартильные размахи не перекрываются, указывая на достоверность различий. Таким образом, протоковая карцинома молочной железы характеризуется повышением уровня миРНК-155 в сравнении с нормальными тканями, также ассоциируется с ER-позитивным статусом опухоли и потенциально может служить диагностическим маркером. Выявленные достоверные различия ($P < 0.05$) по трем миРНК-221, -222 и -155 — позволяют различить эти два типа рака (см. рисунок), что может быть важным в диагностике вторичных опухолей с неясной этиологией.

МиРНК-205. Цитогенетическая локализация в первой хромосоме — 1q32.2, в плюс-цепи, размер 110 п. н. Филогенетически высококонсервативное семейство миР-205/205a,b представлено 34 последовательностями, начиная с представителей костистых рыб. Для миРНК-205 предсказано 416 генов-мишеней в геноме человека (www.targetscan.org). МиРНК-205 относят к онкосупрессорным миРНК. Показано, что в случае некоторых видов опухолей миРНК-205 индуцирует апоптоз и тормозит рост и инвазию клеток опухоли (Wu et al., 2009). Транскрибируется в составе гена-хозяина *MIR205HG* (*LINC00510*), относящегося к длинным межгенным некодирующим генам РНК (lincRNA) (www.ensemble.org).

В наших экспериментах выявлено уменьшение уровня экспрессии миРНК-205 при РМЖ ~ в 20 раз по отношению к нормальной ткани, взятой у того же пациента ($P = 0.05$). В то же время отмечено повышение уровня миРНК-205 при папиллярном РЩЖ (см. рисунок и таблицу).

Таким образом, сравнительный анализ четырех онкогенных (миРНК-21, -221, -222 и -155) и одной онкосупрессорной миРНК (миР-205) в двух разных злокачественных типах опухолей — протоковой инвазивной карциноме молочной железы и папиллярной карциноме щитовидной железы — показал, что профили экспрессии этих миРНК достоверно различаются по четырем миРНК (см. таблицу). Для папиллярного РЩЖ характерно повышение экспрессии всех пяти миРНК, тогда как лишь две из них — миР-21 и миР-155 — сверхэкспрессируются в клетках РМЖ, а экспрессия миР-221, -222 и -205 подавлена. Полученные данные позволяют предположить различные механизмы участия одних и тех же миРНК в процессах онкогенеза этих органов. Разные спектры экспрессии миРНК в разных типах опухолей делают перспективным их использование в качестве диагностических маркеров при онкологических заболеваниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Сибирского филиала фирмы BIORAD (Новосибирск) и частично Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00642-а).

Список литературы

- Колесников Н. Н., Елисафенко Е. А. 2010. Сравнительная организация и происхождение некодирующих регуляторных РНК генов центра инактивации X-хромосомы человека и мыши. *Генетика*. 46 (12): 1389—1391.
- Кондратьева Т. Т. 2007. Морфологическая диагностика узловых образований щитовидной железы. *Практическая онкология*. 8 (1): 9—16.
- Bartel D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281—297.
- Chan J. A., Krichevsky A. M., Kosik K. S. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 65: 6029—6033.
- Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J., Zhou Z., Lee D. H., Nguyen J. T., Barbisin M., Xu N. L., Mahuvakar V. R., Andersen M. R., Lao K. Q., Livak K. J., Guegler K. J. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 33: 1—9.
- Croce C. M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Rev. Genet*. 10: 704—714.
- Esquela-Kerscher A., Slack F. J. 2006. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Rev. Cancer*. 6: 259—269.
- Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B., Bartel D. P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 19: 92—105.
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646—674.
- Hansen T. B., Wiklund E. D., Bramsen J. B., Villadsen S. B., Statham A. L., Clark S. J., Kjems J. 2011. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J*. 30: 4414—4422.
- Kluiver J., Poppema S., de Jong D., Blokzijl T., Harms G., Jacobs S., Kroesen B.-J., van den Berg A. 2005. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol*. 207: 243—249.
- Krichevsky A. M., Gabriele G. 2009. miR-21: a small multifaceted RNA. *J. Cell. Mol. Med*. 13: 39—53.
- Krutovskikh V. A., Hecceg Z. 2010. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays*. 32: 894—904.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294: 853—858.
- Lee Y. S., Dutta A. 2009. MicroRNA in cancer. *Annu. Rev. Pathol*. 4: 199—227.

Seike M., Goto A., Okano T., Bowman E. D., Schetter A. J., Horikawa I., Mathe E. A., Jen J., Yang P., Sugimura H., Gemma A., Kudoh S., Croce C. M., Harris C. C. 2009. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106 : 12 085—12 090.

Sonkoly E., Wei T., Janson P. C. J., Saaf A., Lundeberg L., Tengvall-Linder M., Norstedt G., Alenius H., Homey B., Scheynius A., Stahle M., Pivarcsi A. 2007. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS ONE.* 7 : e610.

Stinson S., Lackner M. R., Adai A. T., Yu. N., Kim H. J., O'Brien C., Spoerke J., Jhunjhunwala S., Boyd Z., Januario T., Newman R. J., Yue P., Bourgon R., Modrusan Z., Stern H. M., Warming S., de Sauvage F. J., Amler L., Yeh R. F., Dornan D. 2011. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epitheli-

al-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci. Signal.* 4(177) : ra41.

Tili E., Michaille J.-J., Wernicke D., Aldera H., Costinean S., Volinia S., Croce C. M. 2011. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *PNAS.* 108 : 4908—4913.

Wu H., Zhu S., Mo Y. Y. 2009. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res.* 19 : 439—448. doi:10.1038/.

Zhao J.-J., Lin J., Yang H., Kong W., He L., Ma X., Coppola D., Cheng J. Q. 2008. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor-alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 283 : 31 079—31 086.

Поступила 26 XI 2012

MICRORNA, EVOLUTION AND CANCER

N. N. Kolesnikov,¹ * S. E. Titov,^{1,2} Yu. A. Veryaskina,¹ E. V. Karpinskaya,³ S. P. Schevschenko,³ L. G. Akhmerova,¹ M. K. Ivanov,² V. V. Kozlov,⁴ E. A. Elisaphenko,⁵ L. F. Gulyaeva,⁶ I. F. Zhimulev¹

¹ Institute of Molecular and Cell Biology SB RAS, Novosibirsk,

² ZAO Vector-Best, Kol'zovo, Novosibirsk region, ³ Municipal Clinical hospital N1, Novosibirsk,

⁴ Novosibirsk Regional Oncological Clinic, ⁵ Institute of Cytology and Genetics SB RAS

and ⁶ Institute of Molecular Biology and Biophysics SB RAMS, Novosibirsk;

e-mail: kolesnikovnn@mcb.nsc.ru

MicroRNAs are known as a posttranscriptional negative regulators of gene expression by binding to the 3'UTP of target mRNAs in cytoplasm. More than 1600 microRNAs expressed in human cells, are involved in the regulation of embryogenesis, differentiation, cell cycle, apoptosis, senescence, thus determining cell fate. Up to 60 % of protein coding genes are under their control. Various sets of microRNAs found in different human tissues under normal and pathological conditions, including cancer, suggest that miRNAs are involved in most cellular pathways. To date, there is no doubt that regulatory potential of the genome is largely determined by miRNAs. In our study, we performed a comparative phylogenetic analysis of the origin and evolution of the total set of 1048 miRNAs in the human genome and investigated the role of certain miRNAs in carcinogenesis of thyroid and mammary glands, as potential diagnostic and prognostic biomarkers of malignancy. Analysis of phylogenetic distribution of miRNAs in the human genome has shown four peaks of appearance of new miRNA genes in the evolution from Methazoa to *H. sapiens*. The highest amount of new miRNA genes appeared after divergence of *H. s.* from common ancestor with *P. t.* Expansion of transposable elements in genome was accompanied by the origin of new miRNA genes on the basis of their sequences. More than 14 % from 1600 miRNAs of human genome originated from mobile elements and still remain. Profiles of expression of 5 miRNAs, pertaining to oncomicroRNAs — miR-21, -221, -222, -155 and -205 — allow distinguishing ductal invasive carcinoma of mammary gland and thyroid papillary carcinoma. The data obtained suggest different ways and roles of participation of the same miRNAs in carcinogenesis of thyroid and mammary glands. So, these miRNAs and profiles of their expression might be used in the diagnosis and prognosis of cancer.

Key words: microRNA, miR-21, -221, -222, -155 and -205, evolution, cancer, mobile elements, biomarkers.