

## ПРООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ микроРНК miR-106a В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ IN VITRO

© Н. В. Палкина, А. В. Комина, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша<sup>1</sup>

*Кафедра патологической физиологии им. проф. В. В. Иванова  
Красноярского государственного медицинского университета  
им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022;*

<sup>1</sup>электронный адрес: [tatyana\\_ruksha@mail.ru](mailto:tatyana_ruksha@mail.ru)

Одними из регуляторов экспрессии генов на посттранскрипционном уровне являются микроРНК. На основе данных об их мультифункциональности эти молекулы рассматривают в качестве возможных мишеней для воздействия на опухолевые клетки. К настоящему времени идентифицировано несколько тысяч разновидностей микроРНК, а также показано изменение их экспрессионных профилей при злокачественной трансформации клеток. В данной работе представлены результаты функционального исследования влияния ингибирования miR-106a на рост, жизнеспособность и гибель опухолевых клеток. При сравнительном анализе экспрессионного профиля в клетках меланомы и в клетках меланоцитарных невусов с помощью метода микрочипирования выявляется достоверное увеличение уровня экспрессии miR-106a. Несмотря на это, ингибирование miR-106a в клетках меланомы не оказывает эффекта на пролиферацию, жизнеспособность, миграционную активность и процессы апоптоза клеток меланомы, но увеличивает их инвазивную активность и способность образовывать колонии. В работе обсуждаются значимость оценки изменений уровней микроРНК при меланоме и других злокачественных новообразованиях, взаимосвязь miR-106a с патогенезом меланомы, а также возможная функциональная роль miR-106a при других патологиях.

**Ключевые слова:** меланома кожи, экспрессионный профиль, микроРНК, miR-106a, пролиферация, миграция, инвазия, апоптоз.

МикроРНК — это эндогенные некодирующие РНК, состоящие из 19—24 нуклеотидов, которые могут модулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, вызывая деградацию или изменяя стабильность трансляционной эффективности мРНК-мишени, благодаря спариванию оснований с комплементарными участками на мРНК-мишени (Bartel, 2004; Zhi et al., 2013).

МикроРНК играют кардинальную роль в регуляции экспрессии большинства генов и тем самым оказывают влияние на различные биологические процессы как в нормальных физиологических условиях, так и при патологических процессах и заболеваниях (Alvarez-García, Miska, 2005). Из-за их многопрофильного значения в регуляции экспрессии генов микроРНК в настоящее время являются предметом активного исследования (Heimberg et al., 2008; Peterson et al., 2009; Berezikov, 2011). Более того, появляется все больше новых данных, указывающих на возможную роль нарушения регуляции микроРНК в патогенезе онкологических заболеваний человека. Уровни некоторых микроРНК резко различаются в разных типах клеток и на разных стадиях развития и коррелируют с изменениями процессов клеточного роста, дифференциации и запрограммированной гибели клеток (Lagos-Quintana et al., 2001; Bartel, 2004). Изменение профилей микроРНК было обнаружено в клетках многих злокачественных опухолей человека, включая карциному молочной железы, первичную глиобластому, рак легких,

папиллярный рак щитовидной железы, рак толстой кишки, а также опухоли поджелудочной железы (Li et al., 2012). Исходя из этого можно предположить, что в регуляции опухолевого роста микроРНК могут играть роль онкогенов либо опухолевых супрессоров. Считается, что если уровень экспрессии определенной микроРНК усиливается при прогрессии опухоли, то данная микроРНК является онкогенной, в то же время если экспрессия микроРНК снижается при развитии и прогрессировании опухоли, то она будет выступать в качестве онкосупрессора (Ventura, Jacks, 2009). Вместе с тем такие предположения должны быть подтверждены функциональными исследованиями, т. е. экспериментально.

Одним из наиболее агрессивных злокачественных новообразований, характеризующихся высокими показателями заболеваемости и смертности, отсутствием эффективной терапии диссеминированных форм и трудностями дифференциальной диагностики ранних форм, является меланома кожи. Заболеваемость меланомой кожи увеличивается не только в Российской Федерации, но и в других странах мира у лиц со светлым типом кожи (Karim-Kos et al., 2008; Каприн и др., 2015). И хотя международные клинические исследования, проводимые на протяжении последних лет, выявили эффективные иммунотерапевтические подходы для поздних стадий меланомы (Ascierto, Marincola, 2014; Stark et al., 2015), тем не менее 5-летняя выживаемость у пациентов с диссемини-

рованной меланомой составляет лишь 5—19 % (Sandru et al., 2014). Все вышеуказанное свидетельствует о необходимости продолжения исследований молекулярных механизмов развития данного новообразования, поиска адекватных диагностических и прогностических маркеров.

МикроРНК благодаря их мультифункциональным регуляторным возможностям в настоящее время рассматривают как потенциальные молекулярные маркеры злокачественных новообразований (Zhang et al., 2015), а также мишени для противоопухолевой терапии (Naidu et al., 2015).

Согласно результатам исследования экспрессионных профилей в культуре меланомы кожи, характеризующейся высокой агрессивностью и метастатическим потенциалом, микроРНК-106а имеет один из наиболее высоких уровней экспрессии (Howell et al., 2010). Соответственно существует высокая вероятность того, что данная микроРНК связана с процессами развития и прогрессирования меланомы кожи. В этой связи микроРНК-106а была выбрана нами для исследования как молекула, возможно играющая роль в патогенезе меланомы кожи. Данные о функциях микроРНК-106а весьма ограничены, что делает актуальным дальнейшее изучение роли данной микроРНК в меланомогенезе.

Целью данного исследования являлась оценка про- и противоопухолевых эффектов miR-106a посредством функционального ингибирования этих молекул в культуре клеток меланомы кожи.

## Материал и методика

Исследование экспрессионного профиля. Для выявления потенциальных онкогенных микроРНК, функциональные свойства которых не установлены для меланомы кожи, осуществляли исследование экспрессионного профиля микроРНК с использованием системы для микрочипирования GeneAtlas™ Microarray System (Affymetrix, США) в клетках меланомы кожи и в клетках доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи. Для этого осуществляли подбор гистологического материала в виде биоптатов, заключенных в парафиновые блоки, от пациентов с меланомой кожи ( $n = 16$ ) и пациентов с пигментными невусами ( $n = 4$ ). Гистологический материал окрашивали гематоксилином—эозином, просматривали во всех полях зрения при увеличении  $400\times$  с помощью микроскопа Olympus BX-41 с видеонасадкой Olympus u-CMAD3 и программного обеспечения Infinity Capture (США). Для исследования отбирали образцы, имеющие более 70 % опухолевой или невусной ткани либо полностью состоящие из этой ткани. Такие образцы измельчали микротомом при толщине среза 15 мкм в необходимом количестве и использовали для дальнейшего исследования. В дальнейшем осуществляли выделение РНК набором RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit. Концентрацию очищенной микроРНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Сингапур) с использованием набора Qubit<sup>®</sup> microRNA Assay kit. Необходимая концентрация микроРНК для дальнейшего выполнения микрочипирования составляла не менее 16.25 нг/мкл. Микрочипирование образцов проводили согласно протоколу фирмы-производителя, достоверность данных, полученных при микрочипировании, оценивали путем автоматического анализа внутренних контролей, добавляе-

мых в растворы на каждом этапе пробоподготовки — полиаденилирования, биотинилирования и гибридизации. Для дальнейшей обработки данных были использованы только образцы, получившие одобрение автоматической системы внутреннего контроля.

Биоинформационный анализ сигнальных путей при участии miR-106a-5p, подтвержденных функциональными исследованиями, проводили с помощью баз данных DIANA miRPath v.3.0. (с применением баз TargetScan v.7.0). Поиск сигнальных путей был проведен на основе базы данных «Киотская классификация генов и геномов» (KEGG).

Культивирование клеток и трансфекция. В экспериментальном исследовании использовали клеточную культуру меланомы линии BRO, предоставленную НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (Новосибирск).

Клетки меланомы BRO культивировали в питательной среде, содержащей L-глутамин RPMI Medium 1640 с 10 % фетальной бычьей сывороткой Fetal Bovine Serum. Культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при содержании углекислого газа 5 % и температуре 37 °С. Смену питательной среды осуществляли 1 раз в сутки.

Трансфекцию осуществляли в 24-луночном планшете при концентрации клеток  $1 \cdot 10^5$  на 1 мл по прилагаемому протоколу, используя положительный контроль Anti-miR hsa-let-7c, отрицательный контроль Anti-miR Negative Control #1 и ингибитор микроРНК-106а Anti-miR hsa-106a-5p. В качестве трансфектанта использовали липофектамин Lipofectamine 2000 Reagent.

Эффективность трансфекции подтверждали стандартным методом детекции изменения экспрессионной активности целевой матричной РНК белка HMGA2, экспрессия которого увеличивается при эффективной трансфекции в геном меланомы положительного контроля — ингибитора микроРНК miR-let-7c. Для этого через 24 ч после трансфекции положительного и отрицательных контролей клетки снимали раствором трипсина, отмывали холодным PBS и выделяли РНК с помощью комплекта реагентов Рибо-золь В по прилагаемому протоколу. Затем ставили реакцию обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов Реверта по прилагаемому протоколу при 37 °С в течение 30 мин. С полученными кДНК ставили реакцию амплификации, используя специфичные праймеры для HMGA2 — Hs00171569\_ml и эндогенного нормирующего контроля β-актина — Hs01060665\_gl.

Термоциклирование выполняли при следующих условиях: 50 °С — 2 мин, 95 °С — 10 мин; 40 циклов: 95 °С — 15 с, 60 °С — 1 мин. ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

Относительные уровни экспрессии исследуемых маркеров рассчитывали по методу ΔΔСТ. Оценку качества трансфекции осуществляли в трех технологических повторях.

Оценка пролиферативной активности клеток после трансфекции ингибитора микроРНК miR-106a. После внедрения в геном ингибитора miR-106a и отрицательного контроля производили определение изменения роста клеток культуры меланомы BRO методом оценки пролиферативной активности клеток меланомы, сравнивая полученные результаты с данными, полученными при трансфекции в культуру стандартизованного «отрицательного контроля». Для этого каждые 24 ч определяли пролиферативную активность

клеток меланомы путем окрашивания бромфеноловым синим, подсчета в камере Горяева и определения концентрации клеток в 1 мл в трех технологических повторах через 24, 48, 72 и 96 ч после трансфекции AntimiR-106a соответственно.

Оценка жизнеспособности клеток после трансфекции ингибитора микроРНК miR-106a. Оценку жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток проводили через 48 ч после трансфекции на основе МТТ-теста. Для выполнения МТТ-теста посев клеточной культуры осуществляли в 96-луночный планшет, затем производили трансфекцию AntimiR-106a и отрицательного контроля по стандартной методике. Через 48 ч после трансфекции после очередной смены питательной среды к клеткам добавляли раствор МТТ в фосфатном буфере в концентрации 5 мг/мл в количестве 10 мкл и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4 ч. Далее клетки отмывали PBS и растворяли в 200 мкл DMSO, затем оценивали оптическую плотность полученного супернатанта на спектрофотометре NanoVue (GE, Германия) при длине волны 570 нм. Уровень жизнеспособности клеток считали соответствующим значению оптической плотности супернатантов. Данное исследование выполняли в трех технологических повторах.

Оценка количества апоптотических клеток после трансфекции ингибиторов микроРНК с помощью проточной цитометрии. Оценку соотношения живых, некротических и апоптотических клеток осуществляли с помощью метода проточной цитометрии. Для этого после трансфекции ингибитора исследуемой микроРНК и отрицательного контроля через 48 ч клетки снимали 0.25%-ным раствором трипсина, отмывали PBS и окрашивали флуоресцентными красителями по прилагаемому протоколу для детекции живых, некротических и апоптотических клеток, используя набор реагентов Annexin V—FITC/7AAD. Принцип действия данного реагента основан на высоком сродстве Аннексина V и фосфатидилсерина и специфичном связывании 7AAD с нуклеотидными парами гуанин—цитозин в ДНК. На ранних стадиях апоптоза целостность клеточной мембраны еще сохраняется, но происходит потеря асимметрии мембранных фосфолипидов, фосфатидилсерин появляется на поверхности клетки, и это является специфичным признаком преапоптоза. Далее клетки анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, США). Таким образом, по результатам детекции окрашенных клеток при проточной цитометрии, клетки, не окрашенные ни Аннексином, ни 7AAD, расценивали как живые, окрашенные только 7AAD и не окрашенные Аннексином — как некротические, окрашенные только Аннексином и не окрашенные 7AAD — как находящиеся в стадии преапоптоза, а окрашенные Аннексином и 7AAD одновременно расценивали как находящиеся в стадии позднего апоптоза. По результатам проточной цитометрии определяли процентное содержание вышеуказанных популяций клеток после ингибирования miR-106a и сравнивали их с соответствующими результатами, полученными в отрицательном контроле. Данное исследование выполняли в трех технологических повторах.

Исследование миграционной активности и инвазивной способности клеток меланомы после ингибирования miR-106a. Исследование данных показателей опухолевой прогрессии после трансфекции ингибитора микроРНК AntimiR-106a прово-

дили с использованием набора CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (8 µm, Colorimetric Format). Для этого через 24 ч после трансфекции ингибитора miR-106a и отрицательного контроля клетки снимали 0.25%-ным раствором трипсина и в концентрации  $1 \cdot 10^5$  на 1 мл в бессывороточной питательной среде вносили во внутренние части специальных вставок для исследования миграции и инвазии, имеющих мембраны, расположенных в лунках 24-луночного культурального планшета. В лунки 24-луночного планшета с наружной части вставки вносили по 400 мкл питательной среды, содержащей 10 % FBS. Через 22 ч после инкубации клетки, прикрепленные к внутренней стороне мембраны вставок, удаляли механически, а клетки, которые мигрировали и прикрепилась к нижней (наружной) поверхности мембран вставки, фиксировали и окрашивали Cell Stain Solution, входящим в комплект, погружая вставку с мембраной в лунки планшета, предварительно наполненные красящим раствором, на 30 мин при комнатной температуре, а затем многократно промывали дистиллированной водой. Далее вставки с мембранами высушивали на воздухе при комнатной температуре и анализировали количество мигрировавших клеток при микроскопии мембран. Среднее число мигрировавших клеток определяли при подсчете не менее чем в трех полях зрения при помощи системы для визуализации клеток Fluid<sup>R</sup> Cell Imaging Station (Life technologies, США). Затем окрашенные клетки растворяли в 200 мкл Extraction Solution, входящего в комплект набора, помещая вставки с мембранами в лунки 24-луночного культурального планшета, предварительно наполненные данным раствором, на 10 мин при комнатной температуре. Полученные супернатанты переносили в лунки в 96-луночного планшета и анализировали поглощение при длине волны 560 нм на планшетном фотометре ЭФОС-9305 (Швабе, Россия). Уровни миграционной и инвазивной активности клеток принимали соответствующими величине поглощения при 560 нм. Исследования были выполнены в трех технологических повторах.

Исследование колониеобразования. Способность к образованию колоний исследовали через 24 ч после трансфекции ингибитора miR-106a и отрицательного контроля. Для этого клетки меланомы после трансфекции снимали 0.25%-ным раствором трипсина и рассевали в лунки 6-луночного культурального планшета в количестве 1000 клеток в лунку. Объем питательной среды составлял 2 мл в лунке. Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при концентрации CO<sub>2</sub> 5 % и температуре 37 °C, смену питательной среды осуществляли 1 раз в 3 сут. Инкубировали клетки до образования ими видимых колоний, насчитывающих 50 опухолевых клеток и более, что в нашем случае составило 5 сут. Далее клетки отмывали раствором PBS, фиксировали 70%-ным этиловым спиртом в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем окрашивали 0.05%-ным раствором Gentian Violet solution в течение 30 мин при комнатной температуре. После окрашивания колонии несколько раз отмывали большим количеством воды, затем высушивали на воздухе при комнатной температуре и подсчитывали число колоний в каждой лунке. Исследование повторяли трехкратно.

Статистическая обработка. При статистической обработке результатов экспериментального исследования использовали методы непараметрической статистики — U-тест Манна—Уитни и дисперсионный анализ Краскела—Уолиса. Статистическую обработку биоинформационного анализа производили при помощи крите-

## Сигнальные пути, регулируемые miR-106a, по результатам биоинформационного анализа

Номер	Наименование пути передачи сигнала <sup>а</sup>	$p^b$
1	Прионные болезни	1.34731278258e-21
2	Процессинг белка в эндоплазматический ретикулум	1.60889947196e-06
3	Клеточный цикл	9.5770965164e-06
4	Эндоцитоз	0.000121278674449
5	TGF- $\beta$	0.000237820456829
6	Деградация лизина	0.00036635832124
7	Протеогликианы при раке	0.00036635832124
8	Фох-О-сигнальный путь	0.00056291040656
9	Циркадные ритмы	0.00056291040656
10	Сигнальные пути при раке	0.00056291040656

<sup>а</sup>Названия сигнальных путей приводятся в соответствии с базой данных DIANA miRPath v.3.0. <sup>б</sup>Уровень статистической значимости.

рия Фишера. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

Использованные реактивы: RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion, Литва); Qubit® microRNA Assay kit (Molecular probes, США); RPMI Medium 1640, Fetal Bovine Serum (Gibco, Life Technologies, США); Anti-miR hsa-let-7c, Anti-miR Negative Control #1, Anti-miR hsa-106a-5p, Hs00171569\_ml, Hs01060665\_gl (Applied Biosystems, США); Lipofectamine 2000 Reagent (Life Technologies, США); Рибо-золь В, Реверта (AmpliSens, Россия); Annexin V—FITC/7AAD (BeckmanCoulter, Франция); CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (8  $\mu$ m, Colorimetric Format) (Cell Biolabs, США); Gentian Violet solution (Sigma, США).

### Результаты и обсуждение

По результатам полного экспрессионного анализа, 904 вида микроРНК имели в клетках меланомы измененный профиль экспрессии по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи. Из них уровни экспрессии 716 видов микроРНК в меланоме были более чем в 2 раза выше, чем в невусной ткани ( $p < 0.05$ ), что позволяет предположить их ключевые позитивные регуляторные роли в процессах прогрессии меланомы кожи. К последней группе микроРНК относится

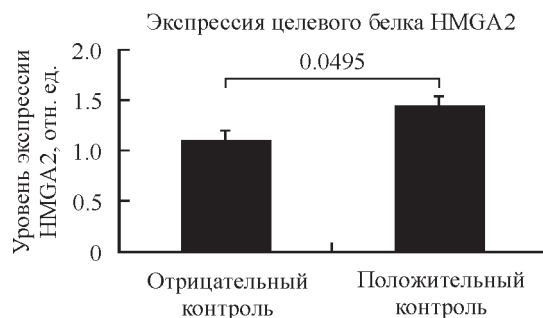


Рис. 1. Результаты оценки эффективности трансфекции.

Статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК HMGA2 в положительном контроле подтверждает ингибирование микроРНК-мишени. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (вертикальные отрезки).

также и микроРНК miR-106a, уровень экспрессии которой в меланоме в 2.5 раза выше, чем в пигментных невусах, что может характеризовать ее как онкогенную микроРНК при меланоме.

По результатам биоинформационного анализа сигнальных путей определены значимые пути сигнальной трансдукции, подтвержденные ранее функциональными исследованиями, в регуляции которых принимает участие miR-106a. Перечень 10 наиболее высокозначимых сигнальных путей представлен в таблице.

Эффективность трансфекции miR-106a была подтверждена результатами экспрессионного анализа HMGA2. Выявили статистически значимое ( $p = 0.0495$ ) увеличение уровня экспрессии данного белка в клетках, трансфицированных положительным контролем, по сравнению с клетками, трансфицированными отрицательным контролем (рис. 1).

Согласно результатам анализа пролиферации клеток при их окраске бромфеноловым синим, для клеток меланомы во всех исследуемых группах был характерен равномерный экспоненциальный рост. Во всех группах через каждые 24 ч наблюдали увеличение числа опухолевых клеток, однако значимых различий между клетками с ингибированной miR-106a по сравнению с отрицательным контролем не выявлено ( $p > 0.05$ ) (рис. 2).

Для верификации описанных выше результатов использовали МТТ-тест. Его результаты также позволяют заключить, что ингибирование miR-106a не влияет на жизнеспособность и пролиферацию клеток меланомы по сравнению с отрицательным контролем ( $p = 0.28$ ) (рис. 3).

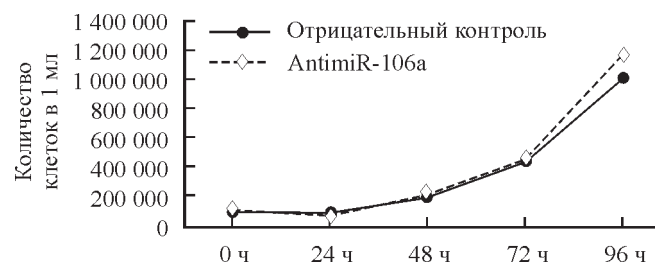


Рис. 2. Пролиферативная активность клеток меланомы после трансфекции ингибитора микроРНК miR-106a.

Доля апоптотических клеток в культуре меланомы после трансфекции ингибитора miR-106a оставалась одинаковой ( $p = 0.13$ ), несмотря на тенденцию к увеличению среднего количества клеток в состоянии апоптоза и преапоптоза при ингибировании miR-106a (рис. 4).

Исследование миграционной активности клеток меланомы после ингибирования miR-106 не выявило значимых различий с контрольной группой ( $p = 0.83$ ) (рис. 5).

Исследование способности клеток меланомы к инвазии показало, что ингибирование микроРНК miR-106a приводит к статистически значимому увеличению способности клеток меланомы расщеплять матригель ( $p = 0.0495$ ) и тем самым способствовать процессам инвазии опухолевых клеток (рис. 6).

Ингибирование miR-106a статистически значимо увеличивает способность клеток меланомы образовывать колонии ( $p = 0.0495$ ), что проявляется в увеличении числа колоний в лунке культурального планшета (рис. 7).

По результатам данного исследования можно резюмировать, что микроРНК miR-106a влияет лишь на некоторые аспекты опухолевой прогрессии клеток меланомы, а ее ингибирование приводит к усилению инвазивной способности клеток меланомы, несмотря на повышение уровня экспрессии данной микроРНК по сравнению с

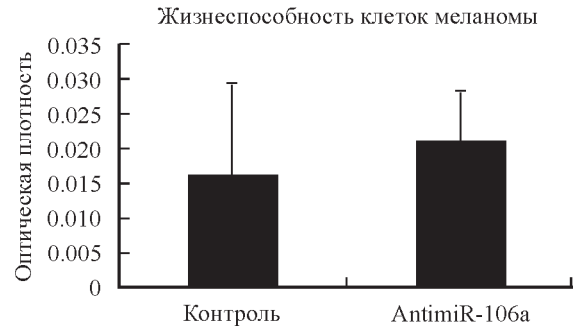


Рис. 3. Результаты МТТ-теста в клетках меланомы после ингибирования микроРНК miR-106a и в отрицательном контроле.

Уровень жизнеспособности клеток считали соответствующим значениям оптической плотности при длине волны 570 нм. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (вертикальные отрезки).

доброкачественными пигментными новообразованиями, выявленное при оценке экспрессионного профиля с помощью микрочипирования. По-видимому, характеристика той или иной микроРНК как «онкогенной» либо «онкосупрессорной» лишь на основании данных об измене-

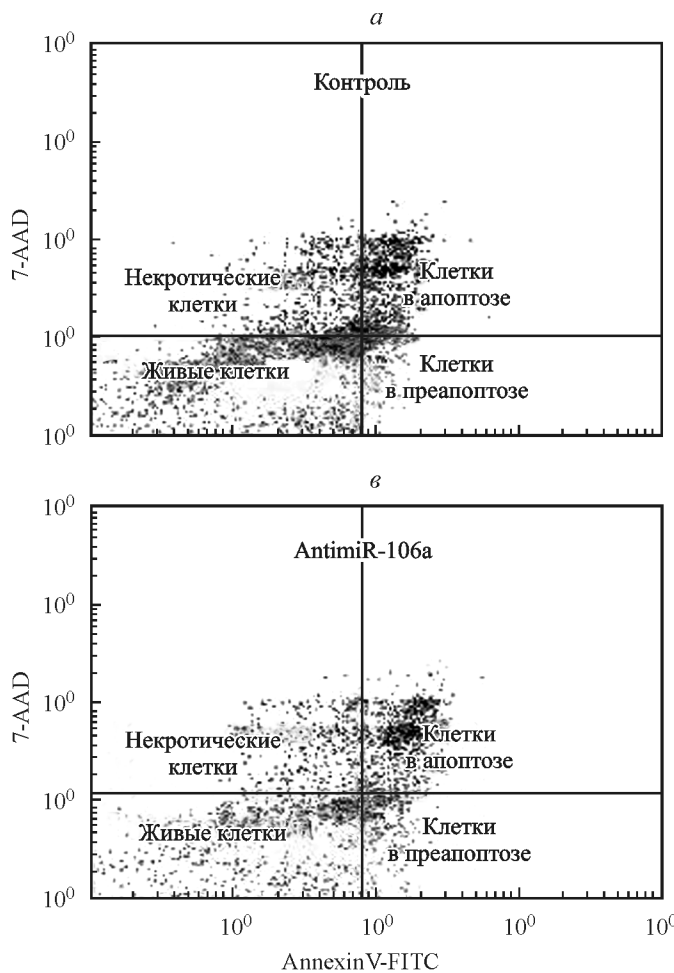


Рис. 4. Результаты оценки апоптоза с помощью метода проточной цитометрии.

*a, б* — соотношение живых, некротических, преапоптотических и апоптотических клеток в контроле и после ингибирования miR-106a соответственно. *б* — доля клеток (%), находящихся в стадии преапоптоза, после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора miR-106a. *з* — процентное содержание клеток (%), находящихся в стадии апоптоза, после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора miR-106a. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (вертикальные отрезки).

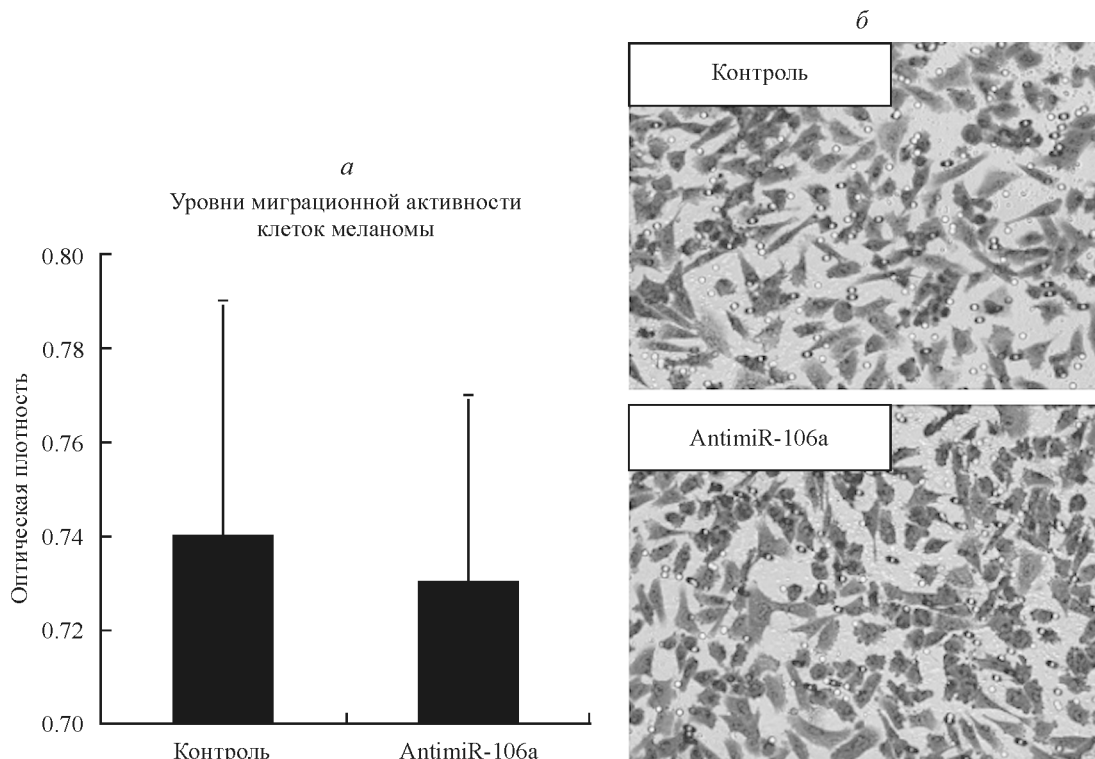


Рис. 5. Результаты оценки миграционной активности клеток меланомы.

*а* — миграционная активность клеток после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора микроРНК miR-106a; показатели миграционной активности клеток считали соответствующими значениям оптической плотности при длине волны 560 нм; данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (*вертикальные отрезки*). *б* — клетки меланомы, мигрировавшие через поры поликарбонатной мембраны после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора miR-106a. Об. 20×.

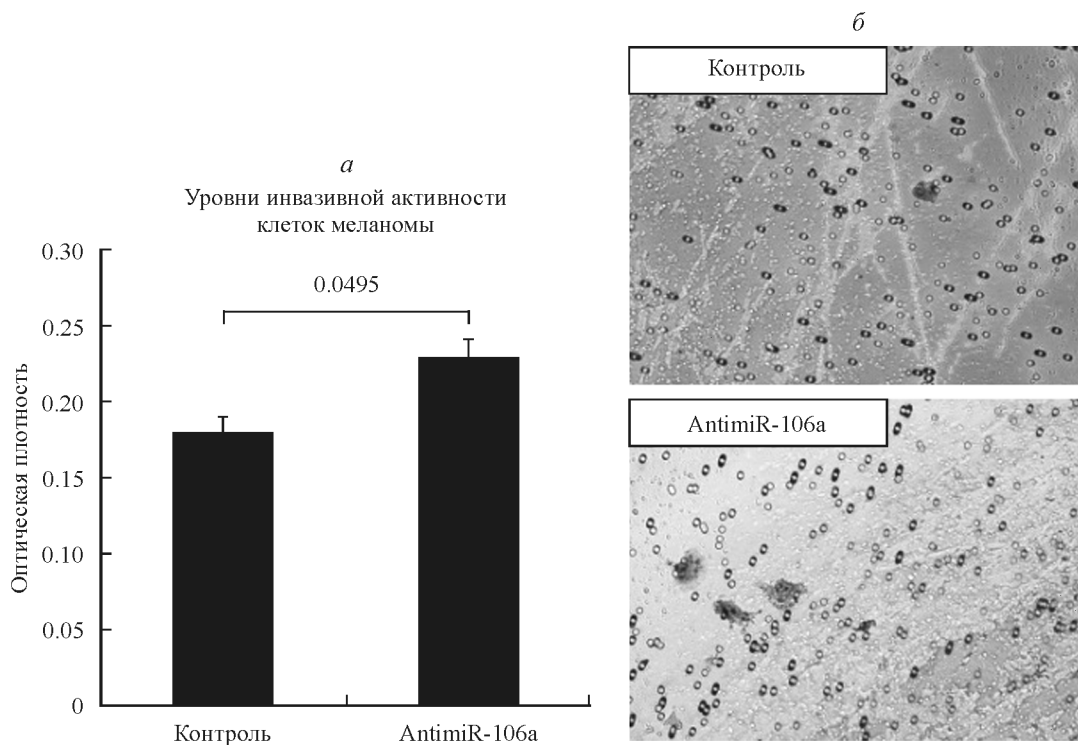


Рис. 6. Результаты оценки инвазивной активности клеток меланомы.

*а* — инвазивная активность клеток после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора микроРНК miR-106a; уровни инвазивной активности считали соответствующими значениям оптической плотности при длине волны 560 нм; данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (*вертикальные отрезки*). *б* — клетки меланомы после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора miR-106a, которые мигрировали через поры поликарбонатной мембраны, покрытой матригелем, благодаря своей способности расщеплять матригель. Об. 20×.

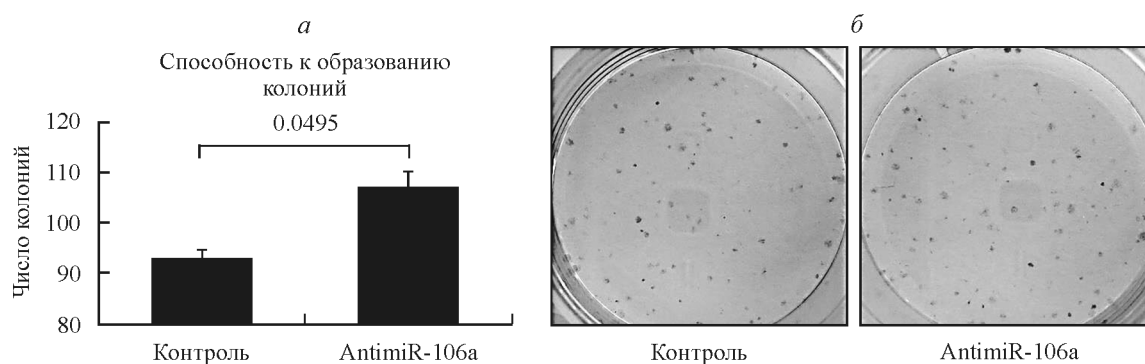


Рис. 7. Результаты оценки способности клеток меланомы образовывать колонии.

*a* — среднее число колоний в лунках 6-луночного культурального планшета при культивировании клеток после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора микроРНК miR-106a; данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (вертикальные отрезки). *б* — колонии клеток меланомы после трансфекции отрицательного контроля и ингибитора miR-106a; колонии, насчитывающие 50 клеток и более, после фиксации и окраски видны невооруженным глазом.

нии ее экспрессионного профиля без дополнительного функционального анализа может быть неточной.

Как показал биоинформационный анализ, микроРНК miR-106a может участвовать в регуляции таких важных сигнальных путей при канцерогенезе, как «TGF- $\beta$ -сигнальный путь», «протеогликаны при раке» и «Fox-O-сигнальный путь». Нарушения функционирования некоторых из перечисленных сигнальных путей, по результатам анализа литературных данных, также имеют значение в меланомагенезе. TGF- $\beta$ -опосредованный механизм передачи сигнала активируется при меланоме кожи, эффекты активации этого пути связывают с процессами деградации внеклеточного матрикса, с процессами инвазии и метастазирования (Lauden et al., 2014). Кроме того, показано, что снижение экспрессии белка Fox-O оказывает влияние на формирование злокачественного фенотипа клеток меланомы (Link, 2015). Интересно, что описана патогенетическая связь между изменениями циркадных ритмов организма и возникновением меланомы. В частности, роль циркадного ритма является важной в контексте функционирования механизмов репарации ДНК и влияния ультрафиолетового излучения и искусственных источников света на развитие меланомы (Markova-Car et al., 2014).

Вместе с тем повышение уровня miR-106a при меланоме по сравнению с меланоцитарными невусами может свидетельствовать об активации базовых, а не только специфических для опухолевых клеток процессов, таких как биохимические реакции обмена веществ и реорганизация цитоскелета. Помимо этого, функционирование miR-106a, возможно, связано с активацией генов «домашнего хозяйства» при усиленных процессах клеточной пролиферации, которые происходят при канцерогенезе. При этом усиление инвазивной способности клеток меланомы при ингибировании miR-106a можно попытаться объяснить эволюционно сформировавшимися механизмами компенсации, когда при «выключении» какого-либо механизма жизнедеятельности срабатывают механизмы адаптации, компенсирующие утраченные функции не только в полной мере, но даже превышая изначальные утраченные функции. В отношении микроРНК это происходит при кластерной функциональной организации микроРНК, когда различные представители кластера могут отвечать за одни и те же функции, но через различные механизмы, что представлено в работе по исследованию механизмов клеточной пролиферации при изменении ак-

тивации различных членов кластера, к которому принадлежит miR-106a (Khuu et al., 2014).

В литературе имеются сообщения об изменении уровней miR-106a при некоторых других злокачественных новообразованиях. Вместе с тем механизмы и последствия этих изменений являются на сегодняшний день неясными. Например, показано, что повышение уровня miR-106a имеет место в клетках злокачественных опухолей желудка, молочной железы, прямой кишки и при немелкоклеточном раке легкого (Yao et al., 2009; Donnem et al., 2012; Feng et al., 2012; Kim et al., 2012). Тем не менее сниженный уровень экспрессии miR-106a установлен при таких злокачественных опухолях, как плоскоклеточный рак кожи, рак толстой кишки и глиома (Zhi et al., 2013).

Установлено, что мишенями для микроРНК miR-106a является супрессор опухолевого роста PTEN, действие которого подавляется в клетках рака предстательной железы посредством miR-106a (Dhar et al., 2015). Тем не менее при карциноме пищевода эта микроРНК выступает в роли антионкогена, так как снижает экспрессию гена SACUL1, регулирующего клеточный цикл и усиливающего процессы пролиферации клеток (Ma et al., 2015). Прямой мишенью для miR-106a является ТИМП-2, и повышение уровня экспрессии данной микроРНК при глиоме и раке поджелудочной железы приводит к повышению инвазивной способности опухолевых клеток (Li et al., 2014; Wang et al., 2015), что противоречит полученным нами результатам об увеличении инвазивной способности клеток меланомы при ингибировании miR-106a.

В отношении неопухольевых процессов показано, что miR-106a способна регулировать макрофагальную инфильтрацию, фагоцитоз и секрецию провоспалительных цитокинов путем таргетирования сигнал-регуляторного протеина-альфа при воспалении (Zhu et al., 2013).

С учетом сравнительно немногочисленных данных об участии miR-106a в различных патологических процессах на данный момент остается открытым вопрос о том, чем обусловлена функциональная «двойственность» данной микроРНК и какие механизмы в этом задействованы. Исследование разнонаправленности эффектов микроРНК является важным для понимания особенностей формирования терапевтических подходов в онкологии на основе модуляции микроРНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00074).

## Список литературы

- Каприн А. Д. 2015. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П. А. Герцена» Минздрава России. 250 с. (Каприн А. Д. 2015. Malignant tumors in Russia in 2013 (incidence and mortality). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П. А. Герцена» Минздрава России. 250 p.)
- Alvarez-Garcia I., Miska E. A. 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 132 : 4653—4662.
- Ascierto P. A., Marincola F. M. 2014. What have we learned from cancer immunotherapy in the last 3 years? *J. Transl. Med.* 12 : 141.
- Bartel D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116 : 281—297.
- Berezikov E. 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* 12 : 846—860.
- Dhar S., Kumar A., Rimando A. M., Zhang X., Levenson A. S. 2015. Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer. *Oncotarget*. 6 : 27 214—27 226.
- Donnem T., Fenton C. G., Lonvik K., Berg T., Ekko K., Andersen S., Stenvold H., Al-Shibli K., Al-Saad S., Bremnes R. M., Busund L. T. 2012. MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*. 7 : e29671.
- Feng B., Dong T. T., Wang L. L., Zhou H. M., Zhao H. C., Dong F., Zheng M. H. 2012. Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PLoS ONE*. 7 : e43452.
- Heimberg A. M., Sempere L. F., Moy V. N., Donoghue P. C., Peterson K. J. 2008. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105 : 2946—2950.
- Howell P. M. Jr., Li X., Riker A. I., Xi Y. 2010. MicroRNA in Melanoma. *Ochsner J.* 10 : 83—92.
- Karim-Kos H. E., de Vries E., Soerjomataram I., Lemmens V., Siesling S., Coebergh J. W. 2008. Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur. J. Cancer*. 44 : 1345—1389.
- Khuu C., Jevnaker A. M., Bryne M., Osmundsen H. 2014. An investigation into anti-proliferative effects of microRNAs encoded by the miR-106a-363 cluster on human carcinoma cells and keratinocytes using microarray profiling of miRNA transcriptomes. *Front. Genet.* 5 : 246.
- Kim K., Chadalapaka G., Lee S. O., Yamada D., Sastre-Garau X., Defossez P. A., Park Y. Y., Lee J. S., Safe S. 2012. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene*. 31 : 1034—1044.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294 : 853—858.
- Lauden L., Siewiera J., Boukouaci W., Ramgolam K., Mourah S., Lebbe C., Charron D., Aoudjit F., Jabrane-Ferrat N., Al-Daccak R. 2014. TGF- $\beta$ -induced (TGFBI) protein in melanoma: a signature of high metastatic potential. *J. Invest. Dermatol.* 134 : 1675—1685.
- Li P., Xu Q., Zhang D., Li X., Han L., Lei J., Duan W., Ma Q., Wu Z., Wang Z. 2014. Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer. *FEBS Lett.* 588 : 705—712.
- Li Y., Zhang D., Chen C., Ruan Z., Li Y., Huang Y. 2012. MicroRNA-212 displays tumor-promoting properties in non-small cell lung cancer cells and targets the hedgehog pathway receptor PTCH1. *Mol. Biol. Cell*. 23 : 1423—1434.
- Link W. 2015. Tribbles breaking bad: TRIB2 suppresses FOXO and acts as an oncogenic protein in melanoma. *Biochem. Soc. Trans.* 43 : 1085—1088.
- Ma H. L., Wen X. P., Zhang X. Z., Wang X. L., Zhao D. L., Che S. M., Dang C. X. 2015. miR-106a\* inhibits the proliferation of esophageal carcinoma cells by targeting CDK2-associated Cullin 1 (CACUL1). *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 61 : 56—62.
- Markova-Car E. P., Jurisić D., Ilić N., Kraljević Pavelić S. 2014. Running for time: circadian rhythms and melanoma. *Tumour Biol.* 35 : 8359—8368.
- Naidu S., Magee P., Garofalo M. 2015. MiRNA-based therapeutic intervention of cancer. *J. Hematol. Oncol.* 8 : 68.
- Peterson K. J., Dietrich M. R., McPeck M. A. 2009. MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays*. 31 : 736—747.
- Sandru A., Voinea S., Panaitescu E., Blidaru A. 2014. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Med. Life*. 7 : 572—576.
- Stark M. S., Klein K., Weide B., Haydu L. E., Pflugfelder A., Tang Y. H., Palmer J. M., Whiteman D. C., Scolyer R. A., Mann G. J., Thompson J. F., Long G. V., Barbour A. P., Soyler H. P., Garbe C., Herington A., Pollock P. M., Hayward N. K. 2015. The prognostic and predictive value of melanoma-related MicroRNAs using tissue and serum: a MicroRNA expression analysis. *EBioMedicine*. 2 : 671—680.
- Ventura A., Jacks T. 2009. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*. 136 : 586—591.
- Wang Z., Wang B., Shi Y., Xu C., Xiao H. L., Ma L. N., Xu S. L., Yang L., Wang Q. L., Dang W. Q., Cui W., Yu S. C., Ping Y. F., Cui Y. H., Kung H. F., Qian C., Zhang X., Bian X. W. 2015. Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. *Oncogene*. 34 : 1407—1419.
- Yao Y., Suo A. L., Li Z. F., Liu L. Y., Tian T., Ni L., Zhang W. G., Nan K. J., Song T. S., Huang C. 2009. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* 2 : 963—970.
- Zhang Y. C., Xu Z., Zhang T. F., Wang Y. L. 2015. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic tools for hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 21 : 9853—9862.
- Zhi F., Zhou G., Shao N., Xia X., Shi Y., Wang Q., Zhang Y., Wang R., Xue L., Wang S., Wu S., Peng Y., Yang Y. 2013. miR-106a-5p inhibits the proliferation and migration of astrocytoma cells and promotes apoptosis by targeting FASTK. *PLoS ONE*. 8 : e72390.
- Zhu D., Pan C., Li L., Bian Z., Lv Z., Shi L., Zhang J., Li D., Gu H., Zhang C. Y., Liu Y., Zen K. 2013. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein  $\alpha$ . *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 : 426—436.e8.



PROONCOGENIC EFFECTS OF INHIBITING THE microRNA miR-106A  
IN SKIN MELANOMA CELLS *IN VITRO*

*N. V. Palkina, A. V. Komina, M. B. Aksenenko, T. G. Ruksha*<sup>1</sup>

Krasnoyarsk State Medical University, Department of Pathophysiology, Krasnoyarsk, 660022;  
<sup>1</sup> e-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru

One of the regulators of gene expression at the post-transcriptional level are miRNAs. Due to its multifunctionality, these molecules are considered as potential targets for controlling the biological behavior of tumor cells. To date, several thousand types of microRNAs have been identified and their expression profiles have shown significant during malignant transformation of cells. In this study, we have investigated the effect of miR-106a functional inhibition on the growth, viability and apoptosis of melanoma cells. Comparative analysis of expression profiles in melanoma cells and in cells of melanocytic nevi identified by the use of microarray has revealed a significant increase in the miRNA expression level in melanoma cells. Despite this, inhibition of this molecule in melanoma cells has no antitumor effect on cell proliferation, viability, migration activity and apoptosis of melanoma cells, but increases invasive activity and the ability to form colonies. The paper discusses the importance of evaluating changes in miRNA levels in melanoma and other malignancies, relationship of miR-106a with the pathogenesis of melanoma, as well as the possible role of miR-106a in other pathologies.

**Key words:** skin melanoma, expression profile, microRNA, miR-106a, proliferation, migration, invasion, apoptosis.

---