

УДК 616.98:579.852.11

Интронные микроРНК генов апоптоза как индикаторы уровня клеточной гибели

© 2019 М. Ю. ШКУРНИКОВ^{1,*}, Ю. А. МАКАРОВА^{1,2}, А. А. ПОЛОЗНИКОВ¹¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, 125284²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

*e-mail: mshkurnikov@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.

После доработки 03.11.2019 г.

Принята к публикации 15.11.2019 г.

Разработан метод оценки апоптоза в клеточных моделях, основанный на анализе экспрессии внутриинтронных микроРНК генов апоптоза. С помощью биоинформационного анализа выявлено 536 генов, ассоциированных с апоптозом. В интронах 30 из них обнаружено 38 пре-микроРНК, кодирующих 41 зрелую микроРНК. Выявлено значимое изменение экспрессии hsa-miR-1244 и hsa-miR-4479 в ответ на индукцию апоптоза в клеточной линии рака молочной железы MCF-7. Также обнаружена связь уровня экспрессии этих микроРНК с размером первичной опухоли (стадией процесса) у больных раком молочной железы.

Ключевые слова: апоптоз, микроРНК, MCF7, рак молочной железы

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-108-113

В настоящее время ведутся работы по созданию микрофизиологических *in vitro* моделей для изучения биодоступности и фармакологической активности препаратов [1]. Одна из них, так называемая «человек-на-чипе», состоит из клеточной модели тонкого кишечника человека на основе первичных культур, клеточной модели печени, лимфатического узла и опухоли молочной железы [2, 3]. Эта модель позволяет не только в значительной степени воспроизвести сложную геометрию эпителия тонкого кишечника, в том числе и отличий, связанных с различной функциональной активностью апикальной и базолатеральной частей кишечного барьера, но и учесть метаболизм препаратов клетками печени и их активность в отношении опухоли.

Оценка жизнеспособности и апоптоза в культуре клеток служит одним из наиболее распространенных и важных показателей их функционального состояния. Большинство существующих методов оценки этих показателей достаточно сложны в исполнении и требуют предварительной

фиксации или лизиса клеток. Это морфометрия [4], определение активности каспаз [5], исследование асимметрии плазматической мембраны клеток при помощи аннексина V, конъюгированного с флуоресцентными красителями [4], изучение состояния митохондрий [6] и оценка фрагментации ДНК. Между тем поиск более простых методов и возможность прижизненной оценки апоптоза очень важна для широкого круга исследований, прежде всего, для оценки состояния клеток в микрофизиологических моделях.

Феномен программируемой клеточной смерти (ПКС) открыт еще в 1972 году [7], и до недавнего времени все относящиеся к ПКС процессы объединяли термином «апоптоз». Однако, благодаря накопленным знаниям, стало понятно, что на самом деле это целая группа процессов, поэтому в 2018 году Номенклатурным комитетом (Nomenclature Committee on Cell Death) была предложена новая классификация, в соответствии с которой выделяют 12 различных типов клеточной гибели [8]. Однако пока эта классификация еще не вошла

Список сокращений: ПКС – программируемая клеточная смерть; РМЖ – рак молочной железы; ФНО – фактор некроза опухоли.

в широкое употребление и большинство этих генетически близких процессов продолжают называть апоптозом. Этот термин используется в аннотациях баз данных, поэтому при их анализе использовали именно его.

Одной из проблем, связанных с применением микрофизиологических моделей, является сложность отслеживания их текущего состояния. Микрофизиологическая модель позволяет отбирать и анализировать культуральную среду, циркулирующую по микроканалам между органоподобными структурами (органоидами) и являющаяся аналогом крови, однако взять образцы клеток из органоедов для анализа не представляется возможным ввиду нарушения при этом целостности всей системы.

В связи с тем, что в моделях «человек-на-чипе» используется всего от нескольких десятков до сотни тысяч клеток, оценка состояния отдельных моделей органов на основе белковых молекул крайне затруднительна. В число перспективных маркеров состояния моделей входят циркулирующие нуклеиновые кислоты, в частности микроРНК. МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, осуществляющие посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. Не менее половины микроРНК человека закодировано в интронах так называемых генов-хозяев, и многие из них транскрибируются одновременно с геном-хозяином [9]. Обнаружена корреляция уровня различных микроРНК с нормальными и патологическими процессами в организме [10, 11]. Известно, что микроРНК, как внутри клетки, так и во внеклеточной среде, полностью экранированы от РНКаз белками-партнерами, принадлежащими к семейству Argonaute, и поэтому обладают высокой стабильностью, в том числе во внеклеточном пространстве [9]. Благодаря этим свойствам микроРНК стали рассматривать в качестве маркеров самых различных состояний как организма, так и его моделей, в том числе клеточных культур. В то же время информация о микроРНК-маркерах апоптоза практически отсутствует.

Целью исследования был поиск микроРНК-маркеров апоптоза в культуре клеток.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Список генов, ассоциированных с апоптозом, был сформирован в базе данных UniProt [12] с использованием данных аннотаций Gene Ontology. На первом этапе были отобраны гены, содержащиеся в аннотации поля «Gene ontology (biologi-

cal process)» термин «apoptosis». На втором этапе были проанализированы отдельные аннотации и выделены содержащие термин «apoptosis», а также информацию о направленности процесса (positive или negative). На третьем этапе гены были разделены на три класса: 1) гены, экспрессия которых снижается при апоптозе (NEG); 2) гены, экспрессия которых повышается при апоптозе (POS); 3) гены, изменяющиеся в различных направлениях в зависимости от типа клеток (POS/NEG), и гены без информации о направлении изменения (NoDirInfo).

Для создания списка интронных микроРНК список микроРНК с их геномными координатами из базы miRBase 22.1 (<http://www.mirbase.org>; файл hsa.gff3) был пересечен со списками генов и экзонов аннотированной сборки человеческого генома GRCh38.p12 с помощью программы bedtools intersect версии 2.26.0. Интронными считали микроРНК, соответствующие пре-микроРНК, целиком лежащим в интронах, и направление транскрипции которых совпадало с направлением транскрипции гена-хозяина.

При анализе влияния индукции апоптоза на микроРНК, локализованные в интронах генов, ассоциированных с апоптозом, использовали результаты анализа микроРНОма клеток MCF-7, подвергавшихся воздействию гипоксии (0,1% кислорода) в течение 48 ч. МикроРНОм оценивали с помощью микрочипов Affymetrix Multispecies miRNA Array [13].

Представленность микроРНК, локализованных в интронах генов, ассоциированных с апоптозом, была проанализирована в 30 образцах послеоперационного материала рака молочной железы (РМЖ) пациентов Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, не подвергавшихся неоадьювантной терапии. Возраст пациентов составил $56,1 \pm 12,7$ лет; средний возраст – 53 года; min–max 34–88. Клиническая характеристика образцов представлена в табл. 1.

Для выделения РНК свежемороженые образцы РМЖ гомогенизировали в жидком азоте, а затем лизировали в Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Германия) для дальнейшего выделения РНК с помощью miRNeasy Mini Kit (Qiagen), как описано ранее [14]. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и инструмента 2100 Bioanalyzer (Agilent Genomics, США) [15, 16]. МикроРНОм анализировали на микрочипах Affymetrix Multispecies miRNA Array, как описано ранее [10].

Совместную обработку результатов анализа микроРНОма образцов клеток MCF-7 и РМЖ, а также оценку экспрессии индивидуальных

Клиническая характеристика больных раком молочной железы (N = 30)**Clinical characteristics of breast cancer patients**

Характеристика	Число пациентов	Характеристика	Число пациентов
Стадия		T (TNM)	
I	4	1	4
II	11	2	12
III	14	3	1
IV	1	4	13
N (TNM)		ER-статус	
0	15	положительный	16
1	7	негативный	14
2	8		
HER2-статус		PR-статус	
положительный	13	положительный	11
негативный	17	негативный	19

Примечание: N (TNM) – поражение лимфатических узлов: 0 – узлы не поражены, 1 – поражены регионарные лимфатические узлы, 2 – поражены отдаленные лимфатические узлы; T (TNM) – размер опухоли: 1 – диаметр опухоли < 2 см, 2 – диаметр 2–5 см, 3 – размер опухоли > 5 см, 4 – опухоль проросла за пределы молочной железы.

Note: N (TNM) – regional lymph nodes involvement: 0 – no regional lymph node metastases, 1 – metastases to movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s), 2 – metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes that are clinically fixed. T (TNM) – primary tumor size: 1 – tumor ≤ 20 mm in greatest dimension, 2 – tumor > 20 mm but ≤ 50 mm in greatest dimension, 3 – tumor > 50 mm in greatest dimension, 4 – tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin.

наборов проб проводили с помощью Affymetrix Expression Console (сборка 1.4.1.46) в режиме «RMA+DAGB-Human_only». Статистический анализ проводили с использованием пакета Affymetrix Transcriptome Analysis Console (версия 3.1.0.5).

Биоинформационные данные анализировали в среде статистических вычислений R. Значимость различий в экспрессии генов и микроРНК оценивали с помощью дисперсионного анализа ANOVA (односторонний тест) и критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гибель клеток в культуре при неблагоприятных условиях (гипоксия, обработка различными реагентами и др.) происходит главным образом в результате апоптоза (который может сопровождаться некрозом). Молекулярные механизмы, ответственные за эти процессы, в значительной степени пересекаются. На основе базы дан-

ных UniProt с использованием данных аннотаций Gene Ontology был сформирован список генов, ответственных за апоптоз. В него вошли 536 генов, из них ингибиторов апоптоза 100, активаторов 125, остальные без однозначных данных (изменение экспрессии некоторых зависит от биологического контекста). В интронах 30 из них обнаружено 38 пре-микроРНК, кодирующих 41 зрелую микроРНК. При индукции апоптоза изменения экспрессии этих микроРНК оценивали в клетках линии MCF-7 до и после индукции клеточной гибели. В результате обнаружена значимая дифференциальная экспрессия трех микроРНК (табл. 2).

Линия MCF-7 обладает большей частью сигнальных каскадов, ведущих к апоптозу, потому ее часто используют как адекватную *in vitro* модель апоптоза. Однако в MCF-7 не экспрессируется каспаза-3 – фермент сигнального каскада одной из основных форм апоптоза – и целостность каспазозависимого пути нарушается [17]. С подобными

Таблица 2

Внутриинтронные микроРНК, экспрессия которых значимо изменяется при апоптозе клеток MCF-7**Differentially expressed intronic miRNAs in apoptosis of MCF-7 cells**

микроРНК	Ген-хозяин	Экспрессия, log ₂ rpm*		Кратность изменения экспрессии	p
		в контроле	при индукции апоптоза		
hsa-miR-4479	<i>TRAF2</i>	2,9 ± 0,5	1,3 ± 0,3	0,3	0,008
hsa-miR-1244	<i>PTMA</i>	9,2 ± 0,8	6,8 ± 0,4	0,2	0,010
hsa-miR-4257	<i>ADAMTSL4</i>	2,4 ± 0,3	3,8 ± 0,5	2,6	0,014

*rpm (reads per million) – число прочтений на 1 млн.

Роль внутриинтронных микроРНК из генов апоптоза в регуляции апоптоза в образцах РМЖ разных стадий

Differential expression of intronic miRNAs in samples of breast cancer with different tumor sizes

Ген-хозяин	Роль в апоптозе гена-хозяина	МикроРНК	Роль в апоптозе микроРНК	Кратность изменения экспрессии	<i>p</i> -value
<i>PTMA</i>	антиапоптотическая	hsa-mir-1244	проапоптотическая [18]	2,89 (4:1)	0,023
<i>TRAF2</i>	антиапоптотическая	hsa-mir-4479	nd	1,75 (4:1)	0,045
<i>AKT2</i>	антиапоптотическая	hsa-mir-641	проапоптотическая, регулирует свой ген-хозяин [19]	2,06 (4:1)	0,023
<i>MAP2K4</i>	проапоптотическая	hsa-mir-744-5p	антиапоптотическая [20, 21]	0,64 (4:1)	0,032
<i>BIRC7</i>	антиапоптотическая	hsa-mir-3196	антиапоптотическая [22]	1,21 (4:2)	0,030
<i>GRK5</i>	антиапоптотическая	hsa-mir-4681	nd	0,89 (4:2)	0,040

Примечание: кратность изменения экспрессии микроРНК дана в сравнении значений в продвинутой стадии РМЖ со значениями в более ранней (стадии по классификации TNM указаны в скобках); nd – роль микроРНК в апоптозе неизвестна.

Note: A multiplicity of changes in miRNA expression in a more advanced stage of breast cancer compared with the initial one is indicated. TNM stage numbers are shown in parentheses. nd – role of microRNA in apoptosis hasn't been known.

проблемами исследователи сталкиваются и при работе с другими иммортализованными клеточными линиями. Учитывая это, кроме клеток MCF-7, мы исследовали образцы опухолевых тканей на разных стадиях прогрессии опухоли из собственной коллекции образцов РМЖ, собранной в МНИОИ им. П.А. Герцена. Исследование проводили на гибридных микроРНК-микрочипах. Образцы тканей распределили по группам, которые сформировали на основании размеров опухолей по классификации TNM, и опреде-

ляли в них экспрессию микроРНК из интронов генов апоптоза. Для шести микроРНК обнаружена сильная корреляция между их экспрессией и размером опухоли (табл. 3); причем для двух из них – hsa-miR-1244 и hsa-miR-4479 (рис. 1) – значимая дифференциальная экспрессия выявлена и в экспериментах с клеточной линией РМЖ (табл. 2).

В опухолях РМЖ с развитием стадии заболевания экспрессия микроРНК, локализованных в интронах генов-хозяев с антиапоптотическим действием, возрастала, а с проапоптотическим

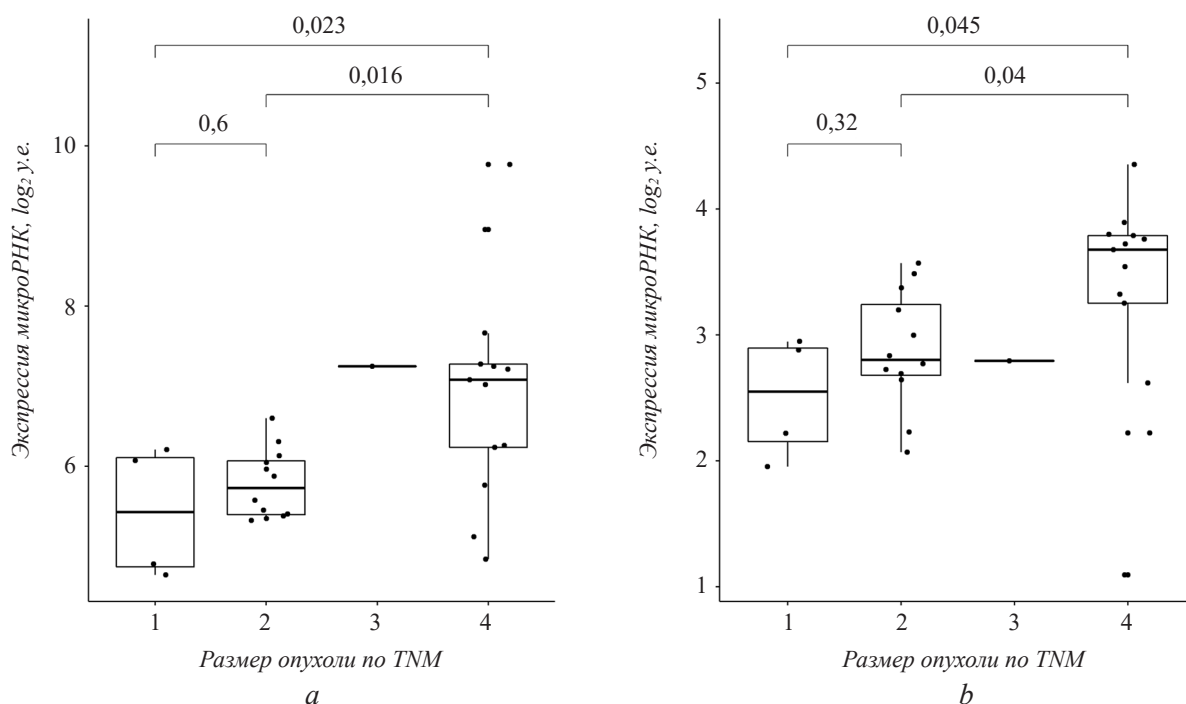


Рис. 1. Экспрессия hsa-miR-1244 (a) и hsa-miR-4479 (b) в образцах РМЖ с различным размером опухоли. Размер опухоли по TNM: 1 – опухоль менее 2 см в диаметре, 2 – размер опухоли от 2 до 5 см, 3 – размер опухоли более 5 см, 4 – опухоль проросла за пределы молочной железы. Над скобками дана значимость различий по *T*-критерию Вилкоксона

Fig. 1. Expression of hsa-miR-1244 (a) and hsa-miR-4479 (b) in samples of breast cancer with different tumor size

действием снижалась, за единственным исключением (табл. 3). Это согласуется с современными представлениями о механизме онкогенеза – неконтролируемая пролиферация клеток опухоли, в которых подавлен апоптоз. Таким образом, логично ожидать повышения экспрессии антиапоптотических генов и супрессии проапоптотических. Следует сказать, что микроРНК, для которых обнаружена дифференциальная экспрессия при апоптозе и развитии опухолевого процесса, в большинстве случаев, как и гены-хозяева, вовлечены в регуляцию апоптоза, однако, их роль, как правило, противоположная (табл. 3). Это еще одна иллюстрация сбалансированности клеточных регуляторных путей. Вызывает интерес микроРНК hsa-miR-641, которая регулирует экспрессию своего гена-хозяина [19].

Следует обратить внимание, что для микроРНК hsa-miR-1244 и hsa-miR-4479 результаты экспериментов, проведенных на образцах опухолей РМЖ и в клеточной линии MCF-7 РМЖ, хорошо согласуются. Так, при прогрессии опухоли, естественном процессе подавления апоптоза, уровень этих микроРНК возрастает, а при активации апоптоза в культуре клеток, т.е. ингибировании антиапоптотических генов-хозяев, – снижается.

Одна из копий hsa-miR-1244 закодирована в 3'-нетранслируемой области гена *PTMA*. Ранее показано, что высокий уровень этой микроРНК положительно коррелирует с общей выживаемостью пациентов с немелкоклеточным раком легкого после лечения цисплатином [23]. Этот ген-хозяин оказывает антиапоптотическое действие [24].

МикроРНК hsa-miR-4479 расположена в интроне гена *TRAF2*. Этот ген кодирует фактор некроза опухолей (ФНО) – рецепторассоциированный фактор, осуществляющий убиквитинирование ключевых регуляторов апоптоза: BIRC3, RIPK1 и TICAM1 [25] – и таким образом проявляет антиапоптотический эффект.

На основании полученных результатов можно заключить, что микроРНК hsa-miR-1244 и hsa-miR-4479 можно рассматривать как перспективные маркеры апоптоза и в клеточных моделях, и в образцах опухолей *ex vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект RFMEFI61618X0092).

ЛИТЕРАТУРА

- Marx U., Andersson T.B., Bahinski A., et al. Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. *ALTEX*, 2016, 33(3), 272–321.
- Maschmeyer I., Hasenberg T., Jaenicke A., et al. Chip-based human liver–intestine and liver–skin co-cultures – a first step toward systemic repeated dose substance testing *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, 95(A), 77–87.
- Poloznikov A., Gazaryan I., Shkurnikov M., et al. *In vitro* and *in silico* liver models: Current trends, challenges and opportunities. *ALTEX*, 2018, 35(3), 397–412.
- Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.*, 2011, 103, 55–98.
- Fan T.-J., Han L.-H., Cong R.-S., et al. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2005, 37(11), 719–727.
- Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., et al. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*, 2011, 79(6), 405–425.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, 26(4), 239–257.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, 2018, 25(3), 486–541.
- Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Turchinovich A.A., et al. Circulating microRNAs. *Biochemistry (Mosc.)*, 2015, 80(9), 1117–1126.
- Maltseva D. V., Galatenko V. V., Samatov T.R., et al. miRNome of inflammatory breast cancer. *BMC Res. Notes*, 2014, 7(1), 871.
- Makarova J.A., Maltseva D. V., Galatenko V. V., et al. Exercise immunology meets miRNAs. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2014, 20, 135–164.
- The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.*, 2019, 47(D1), D506–D515.
- Bandara V., Michael M.Z., Gleadle J.M. Hypoxia represses microRNA biogenesis proteins in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2014, 14(1), 533.
- Khaustova N.A., Maltseva D. V., Oliveira-Ferrer L., et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie*, 2017, 142, 197–206.
- Fomicheva K.A., Osip'yants A.I., Knyazev E.N., et al. Detection of potential metastatic prostate cancer circulating biomarkers by comparison of miRNA profiles in DU145 cells and culture medium. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, 162(6), 792–796.
- Krainova N.A., Khaustova N.A., Makeeva D.S., et al. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49(9), 743–749.
- Jänicke R.U., Sprengart M.L., Wati M.R., et al. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(16), 9357–9360.

18. Li W., Wang W., Ding M., et al. MiR-1244 sensitizes the resistance of non-small cell lung cancer A549 cell to cisplatin. *Cancer Cell Int.*, 2016, 16(1), 30.
19. Hinske L.C., Heyn J., Hübner M., et al. Intronic miRNA-641 controls its host gene's pathway PI3K/AKT and this relationship is dysfunctional in glioblastoma multiforme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, 489(4), 477–483.
20. Chen X.-F., Liu Y. MicroRNA-744 inhibited cervical cancer growth and progression through apoptosis induction by regulating Bcl-2. *Biomed. Pharmacother.*, 2016, 81, 379–387.
21. Zhou W., Li Y., Gou S., et al. MiR-744 increases tumorigenicity of pancreatic cancer by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget*, 2015, 6(35), 37557–37569.
22. Ji Z.-C., Han S.-H., Xing Y.-F. Overexpression of miR-3196 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis through targeting ERBB3 in breast cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2018, 22(23), 8383–8390.
23. Li G.-J., Zhao G.-Q., Yang J.-P., et al. Effect of miR-1244 on cisplatin-treated non-small cell lung cancer via MEF2D expression. *Oncol. Rep.*, 2017, 37(6), 3475–3483.
24. Pai C.-W., Chen Y.-H. Transgenic expression of prothymosin alpha on zebrafish epidermal cells promotes proliferation and attenuates UVB-induced apoptosis. *Transgenic Res.*, 2010, 19(4), 655–665.
25. Alvarez S.E., Harikumar K.B., Hait N.C., et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, 2010, 465(7301), 1084–1088.

Intronic miRNAs of Apoptosis Genes as Indicators of Cell Death

M. Yu. SHKURNIKOV^{1,*}, J.A. MAKAROVA^{1,2}, and A.A. POLOZNIKOV¹

¹*Herzen Moscow Oncology Research Center, National Medical Research Radiological Center, Moscow, 125284 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: mshkurnikov@gmail.com*

Received October 07, 2019

Revised November 3, 2019

Accepted November 15, 2019

Abstract—A method to assess the apoptosis level in cell models based on the analysis of the expression of micRNAs located in introns of apoptosis genes has been developed. Bioinformation analysis identified 536 genes associated with apoptosis; 30 of them contained 38 pre-microRNAs encoding 41 mature microRNAs. A significant change in the expression of hsa-miR-1244 and hsa-miR-4479 in response to apoptosis induction in the MCF-7 breast cancer cell line was revealed. A correlation was also found between the expression level of these miRNAs and the size of the primary tumor (process stage) in patients with breast cancer.

Keywords: apoptosis, microRNA, MCF7, breast cancer

Funding—This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project no. RFMEFI61618X0092).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-108-113