

УДК 575:599.9

## Роль микроРНК в регуляции экспрессии генов *AXL*, *DAPK1*, *NFIB* при раке молочной железы

Пронина И.В.<sup>1</sup>, Филиппова Е.А.<sup>1</sup>, Лукина С.С.<sup>2</sup>, Бурденный А.М.<sup>1</sup>, Казубская Т.П.<sup>3</sup>, Брага Э.А.<sup>1,4</sup>, Логинов В.И.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 115478, Москва, Каширское ш., д. 23

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр». 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

*Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется эпигенетическими нарушениями, которые приводят к нарушению регуляции экспрессии опухоли ассоциированных белок-кодирующих генов, что влияет на развитие опухоли. Цель исследования – поиск новых микроРНК, потенциально вовлеченных в регуляцию экспрессии 3 белок-кодирующих генов (*AXL*, *DAPK1*, *NFIB*), связанных с регуляцией апоптоза и эпителиально-мезенхимально-перехода при РМЖ. Методом количественной ПЦР определены изменения экспрессии 3 белок-кодирующих генов (*AXL*, *DAPK1*, *NFIB*) и 3 микроРНК (*miR-127-5p*, *-132-3p*, *-9-5p*), предсказанных с помощью алгоритмов *miRWalk 2.0* как регуляторные. Определены статистически значимые отрицательные корреляции между изменениями уровней экспрессии микроРНК и мРНК для следующих пар: *miR-127-5p* – *DAPK1* ( $R_s = -0,503$ ,  $p = 0,001$ ) и *miR-9-5p* – *DAPK1* ( $R_s = -0,335$ ,  $p = 0,040$ ). Таким образом, установлена потенциальная роль двух микроРНК в регуляции экспрессии гена *DAPK1*, активатора различных путей апоптоза и негативного регулятора ЭМП, что имеет фундаментальное значение и может найти применение для разработки таргетной терапии РМЖ.*

**Ключевые слова:** рак молочной железы; микроРНК; мРНК; апоптоз.

**Для цитирования:** Пронина И.В., Филиппова Е.А., Лукина С.С., Бурденный А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Роль микроРНК в регуляции экспрессии генов *AXL*, *DAPK1*, *NFIB* при раке молочной железы. *Патогенез*. 2018; 16(4): 130-133

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.130-133

**Для корреспонденции:** Логинов Виталий Игоревич, e-mail: loginov7w@gmail.com

**Финансирование:** Работа выполнена за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-315-00311 мол-а).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 07.10.2018

## The role of miRNA in regulation of *AXL*, *DAPK1*, *NFIB* gene expression in breast cancer

Pronina I.V.<sup>1</sup>, Filippova E.A.<sup>1</sup>, Lukina S.C.<sup>2</sup>, Burdenny A.M.<sup>1</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>3</sup>, Braga E.A.<sup>1</sup>, Loginov V.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

<sup>3</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation

<sup>4</sup> Medical Genetics Research Center, Moskvorechje Str. 1, Moscow 115478, Russian Federation

*Breast cancer (BC) is characterized by epigenetic disorders, which lead to dysregulation of protein-coding gene expression; together these result in development of a tumor. The goal of the study was to search for new miRNAs that are potentially involved in regulation of the expression of three protein-coding genes (*AXL*, *DAPK1*, *NFIB*) associated with regulation of apoptosis and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. Quantitative PCR was used to determine changes in the expression of three protein-coding genes (*AXL*, *DAPK1*, *NFIB*) and three miRNAs (*miR-127-5p*, *-132-3p*, *-9-5p*) that had been predicted to be regulators by *miRWalk 2.0* algorithms. Statistically significant negative correlations between changes in miRNA and mRNA expression were determined for the following pairs: *miR-127-5p* – *DAPK1* ( $R_s = -0.503$ ,  $p = 0.001$ ) and *miR-9-5p* – *DAPK1* ( $R_s = -0.335$ ,  $p = 0.040$ ). Therefore, the study showed a potential role of two miRNAs in regulation of the *DAPK1* gene expression, an activator of various apoptotic pathways and a negative regulator of EMT. This result is fundamentally important and can be used to develop targeted therapies for breast cancer.*

**Keywords:** breast cancer; miRNA; mRNA; apoptosis.

**For citation:** Pronina I.V., Filippova E.A., Lukina S.C., Burdenny A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I. [The role of miRNA in regulation of *AXL*, *DAPK1*, *NFIB* gene expression in breast cancer]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 130-133 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.130-133

**For correspondence:** Loginov Vitaly Igorevich, e-mail: loginov7w@gmail.com

**Funding.** The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-315-00311 mol-a).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 07.10.2018

## Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием среди женщин и в мире ежегодно выявляют более 1,6 млн. случаев первичного РМЖ; в 2017 г. в России выявлено более 70500 новых случаев этого заболевания [1]. РМЖ характеризуется генетическими и эпигенетическими нарушениями, которые приводят к активации или подавлению экспрессии многих опухолевых ассоциированных генов [2]. Так, экспрессия генов, кодирующих белки, может нарушаться при РМЖ под действием микроРНК (миРНК). Полагают, что миРНК регулируют экспрессию более 60% белок-кодирующих генов и участвуют в регуляции таких процессов, как пролиферация и дифференцировка клетки, апоптоз и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [3]. Данная работа нацелена на изучение роли группы миРНК в регуляции экспрессии 3 генов *AXL*, *DAPK1*, *NFIB*, связанных с ключевыми процессами в онкогенезе, как инициация апоптоза и ЭМП, при РМЖ.

## Материалы и методы исследования

Парные образцы опухолевой и здоровой ткани (режектонный материал) получали в Отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ НМИЦ Онкологии им. Н.Н.Блохина. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). Использовали ткани только тех больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Отбирали образцы с содержанием опухолевых клеток не менее 70%. Выборка включала 38 парных (опухоль / прилежащая гистологически нормальная ткань) образцов РМЖ. В рамках данной работы был проведен биоинформатический анализ с привлечением алгоритмов базы данных: miRWalk 2.0 для отбора миРНК, потенциально участвующих в регуляции экспрессии генов *AXL*, *DAPK1*, *NFIB*. Были отобраны

3 миРНК (miR-127-5p, -132-3p, -9-5p), предсказанные как взаимодействующие с мРНК данных генов с использованием 4 или более алгоритмов из 9 программ, содержащихся в miRWalk 2.0. Тотальную РНК выделяли из образцов по стандартной методике и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Оценку содержания миРНК выполняли с применением методов ПЦР в реальном времени на приборе фирмы Bio-Rad (CFX96) с использованием лицензионных наборов Applied Biosystems – Taq Man MicroRNA Assays Kit (USA): miR-127-5p (Assay ID: 002229), miR-132-3p (Assay ID: 000457), miR-9-5p (Assay ID: 000583) и для нормализации уровня экспрессии использованы RNU48 (Assay ID: 001006) и RNU6 (Assay ID: 001093). При анализе мРНК применяли qPCRmix-HS SYBR (Россия) и в качестве гена сравнения использовали транскрипт гена *B2M* ( $\beta$ -2-microglobulin gene) [4]. Праймеры приведены в табл. 1.

Учитывали изменения количества мРНК в опухолях по сравнению с условной нормой в 3 или более раз. Статистическую обработку данных проводили с применением точного критерия Фишера. Конкордантность данных оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена в программе IBM SPSS Statistics Base 20. Уровень значимости принят равным  $p < 0,05$ . Для коррекции множественных сравнений использован метод Бенджамини-Хохберга с расчетом FDR (False Discovery Rate).

## Результаты исследования и обсуждение

Проведено исследование уровня экспрессии (мРНК) генов *ACSL1*, *AURKA*, *AXL*, *DAPK1*, *NFIB* в 38 парных образцах РМЖ. У онкологических больных количество мРНК в опухолях изменялось в 3-1000 раз по сравнению с гистологически нормальной тканью того же пациента и эти изменения наблюдались с высокой частотой. При анализе результатов учитывались как снижение и повышение уровня мРНК, так и образцы без изменения экспрессии (табл. 2). Нами показано статистически значимое снижение по сравнению с повышением уровня

Таблица 1

Праймеры, условия и продукты ПЦР.

Ген	Структура праймеров (5'-3')	$T_{\text{отж.}}$ , °C	Размер продукта, п.н.	Ссылка
<i>AXL</i>	F: TACCGCGTGCGCAAGTCCSTACA R: TGGCAATCTTCATCGTCTTCACAG	60	226	#
<i>DAPK1</i>	F: CAGTTTGCGGTTGTGAAGAA R: CCTGCAACGAGTCCAAGAT	58	227	[5]
<i>NFIB</i>	F: AAACCCAGCACTTTGTGTCC R: ATGGGCGTTCTGGATACTCTTA	60	219	#
<i>B2M</i>	F: TGACTTTGTACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	58	81	[4]

**Примечание:** # – праймеры подобраны с помощью программы Primer Select из набора программ Lasergene (<https://www.dnastar.com/>)

Таблица 2

## Частота изменения экспрессии 3 белок-кодирующих генов и 3 миРНК при РМЖ.

Ген /миРНК	Снижение	Повышение	Изменений НЕТ
Белок-кодирующие гены			
DAPK1	59% (24/41)	24% (10/41)	17% (7/41)
NFIB	68% (28/41)	12% (5/41)	20% (8/41)
AXL	64% (23/36)	11% (4/36)	25% (9/36)
миРНК			
miR-127-5p	39% (15/38)	8% (3/38)	53% (20/38)
miR-132-3p	50% (19/38)	5% (2/38)	45% (17/38)
miR-9-5p	39% (15/38)	29%(11/38)	32% (12/38)
<b>Примечание:</b> изменения с высокой частотой выделены жирным шрифтом.			

экспрессии для 3 белоккодирующих генов (*AXL*, *DAPK1*, *NFIB*,  $p < 0,001$ , FDR = 0,01). При анализе образцов РМЖ показано также частое снижение содержания в опухоли по сравнению с гистологически неизменной нормой для миРНК: - miR-132-3p, ( $p < 0,001$ , FDR = 0,01). Значимое изменение уровня экспрессии миРНК miR-127-5p, miR-9-5p отмечено не было.

При оценке конкордантности изменений уровней экспрессии 3 генов миРНК и 3 белоккодирующих генов, предсказанных как потенциальные мишени по данным miRWalk2.0 (*AXL*, *DAPK1*, *NFIB*,) были выявлены отрицательные корреляции для следующих пар: miR-127-5p – DAPK1 ( $R_s = -0,503$ ,  $p = 0,001$ , FDR = 0,05); miR-9-5p – DAPK1 ( $R_s = -0,335$ ,  $p = 0,040$ , FDR = 0,1) (табл. 3), что позволяет предполагать прямое или опосредованное взаимодействие между миРНК и мРНК в этих парах.

Таким образом, полученные нами данные расширяют спектр опухолей ассоциированных генов и миРНК, изменяющих профиль экспрессии в опухолях молочной железы. Нами определены новые потенциально регуляторные миРНК для гена *DAPK1*, активатора различных путей апоптоза и негативного регулятора ЭМП [6]. Полученные сведения могут также найти применение для разработки таргетных лекарственных средств на основе миРНК для лечения РМЖ.

## Список литературы

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) М.: ФГБУ МНИОИ им. П.А.Герцена Минздравсоцразвития России, 2018, 250 с.
- van de Vijver M.J. Molecular tests as prognostic factors in breast cancer. *Virchows Arch.* 2014; 464(3): 283-91. DOI: 10.1007/s00428-014-1539-0
- Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия.* 2015; 80(2): 184-203. DOI: 10.1134/S0006297915020029

Таблица 3

Потенциально-взаимодействующие пары миРНК – мРНК при РМЖ: коэффициенты корреляции Спирмена ( $R_s$ )

	miR-127-5p	miR-132-3p	miR-9-5p
<i>AXL</i>	$R_s = -0,242$ $p = 0,175$	$R_s = 0,256$ $p = 0,151$	$R_s = 0,315$ $p = 0,074$
<i>DAPK1</i>	$R_s = -0,503$ $p = 0,001$	$R_s = -0,089$ $p = 0,594$	$R_s = -0,335$ $p = 0,040$
<i>NFIB</i>	$R_s = 0,206$ $p = 0,215$	$R_s = -0,042$ $p = 0,804$	$R_s = 0,075$ $p = 0,654$
<b>Примечание:</b> высокие величины коэффициента корреляции Спирмена $R_s$ и значимые величины $p$ выделены жирным шрифтом.			

- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Dmitriev A.A., Braga E.A. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene.* 2016; 576(1 Pt 3): 483-91. DOI: 10.1016/j.gene.2015.10.059
- Wang L.Q., Kwong Y.L., Wong K.F., Kho C.S., Jin D.Y., Tse E., Rosèn A., Chim C.S. Epigenetic inactivation of mir-34b/c in addition to mir-34a and DAPK1 in chronic lymphocytic leukemia. *J. Transl. Med.* 2014; 12: e52. DOI: 10.1186/1479-5876-12-52
- Yuan W., Ji J., Shu Y., Chen J., Liu S., Wu L., Zhou Z., Liu Z., Tang Q., Zhang X., Shu X. Downregulation of DAPK1 promotes the stemness of cancer stem cells and EMT process by activating ZEB1 in colorectal cancer. *J. Mol. Med. (Berl).* 2018. DOI: 10.1007/s00109-018-1716-8

## References

- Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. [*Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality)*] M.: FSBI Moscow in Russian P.A. Herzen Health Ministry of Russia, 2018, 250 p. (in Russian)
- van de Vijver M.J. Molecular tests as prognostic factors in breast cancer. *Virchows Arch.* 2014; 464(3): 283-91. DOI: 10.1007/s00428-014-1539-0
- Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. [Methylation of miRNA genes and oncogenesis]. *Biokhimiya [Biochemistry].* 2015; 80(2): 145-162. DOI: 10.1134/S0006297915020029 (in Russian)
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Dmitriev A.A., Braga E.A. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene.* 2016; 576(1 Pt 3): 483-91. DOI: 10.1016/j.gene.2015.10.059
- Wang L.Q., Kwong Y.L., Wong K.F., Kho C.S., Jin D.Y., Tse E., Rosèn A., Chim C.S. Epigenetic inactivation of mir-34b/c in addition to mir-34a and DAPK1 in chronic lymphocytic leukemia. *J. Transl. Med.* 2014; 12: e52. DOI: 10.1186/1479-5876-12-52
- Yuan W., Ji J., Shu Y., Chen J., Liu S., Wu L., Zhou Z., Liu Z., Tang Q., Zhang X., Shu X. Downregulation of DAPK1 promotes the stemness of cancer stem cells and EMT process by activating ZEB1 in colorectal cancer. *J. Mol. Med. (Berl).* 2018. DOI: 10.1007/s00109-018-1716-8

---

**Сведения об авторах:**

*Пронина Ирина Валерьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»*

*Филиппова Елена Александровна – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»*

*Лукина Светлана Сергеевна – студентка 4 курса Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)*

*Бурденный Алексей Михайлович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»*

*Казубская Татьяна Павловна – доктор медицинских наук, врач-онкогенетик, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

*Брага Элеонора Александровна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»*

*Логинов Виталий Игоревич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»*