

Роль микро-РНК при солидных опухолях

ФЕДЯНИН МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ, ИГНАТОВА ЕКАТЕРИНА ОЛЕГОВНА, ТЮЛЯНДИН СЕРГЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

Последнее десятилетие сопровождается появлением большого количества исследований, посвященных роли малых, не кодирующих белок, молекул РНК (микро-РНК) в канцерогенезе и развитии резистентности к проводимой противоопухолевой терапии. Семейство генов микро-РНК составляет немногим более 1% от всего генома человека, но регулирует экспрессию почти трети всех генов на посттранскрипционном уровне. При нарастающем внимании специалистов к персонализированному подходу в лечении онкологических больных, внедрение знаний по роли микро-РНК в клинику позволит в будущем индивидуализировать подход в лечении этого сложного контингента пациентов.

В этом обзоре приводится информация о номенклатуре и механизмах образования микро-РНК, анализируется взаимосвязь между профилем экспрессии микро-РНК и фенотипом опухоли, а также обсуждается возможное применение микро-РНК в клинической практике.

Ключевые слова: микро-РНК, факторы прогноза, предикторные факторы

Контактная информация:

М.Ю. Федянин, к.м.н., врач-онколог отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ Российский онкологический научный центр им. А.Н. Блохина РАМН, fedianinmu@mail.ru

Е.О. Игнатова, аспирант отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ Российский онкологический научный центр им. А.Н. Блохина РАМН, md.ignatova@gmail.ru

С.А. Тюляндин, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ Российский онкологический научный центр им. А.Н. Блохина РАМН, stjulandin@gmail.com.

Введение

Последнее десятилетие сопровождается появлением большого количества исследований, посвященных роли малых, не кодирующих белок молекул РНК (микро-РНК) в канцерогенезе. Семейство генов микро-РНК составляет немногим более 1% от всего генома человека, но регулирует экспрессию почти трети всех генов на посттранскрипционном уровне, при этом являясь наиболее консервативным по последовательностям и механизмам экспрессии. Эти 21-нуклеотидные РНК участвуют в большом количестве генетических регуляторных механизмов вирусов, растений, животных и человека. Выявлена ключевая роль

микро-РНК в нарушении баланса пролиферации, дифференцировки и запрограммированной клеточной смерти при развитии различных заболеваний, в том числе онкологической патологии. Профиль микро-РНК зачастую различается между клетками различных тканей и опухолей, что в свою очередь может помочь определить органную принадлежность опухолей, предсказать ответ на терапию и определить прогноз течения болезни. В этом обзоре мы анализируем взаимосвязь между профилем экспрессии микро-РНК и фенотипом опухоли, а также обсуждаем возможное применение микро-РНК в клинической практике.

Механизм образования микро-РНК

Путь образования микро-РНК (miRNA) начинается с транскрипции кодирующих генов с помощью РНК полимеразы II. Отмечено, что у млекопитающих более 90% микро-РНК кодируются нуклеотидными последовательностями, которые находятся в интронах (участках ДНК, являющихся частью генов, но не содержащих информации о последовательности аминокислот кодируемого им белка). Для сравнения, только 14% микро-РНК червей и мух кодируются генами, локализованными в интронах [2, 3]. Интрон, состоящий из 400 пар нуклеотидов, вырезается из первичного транскрипта и становится первичной микро-РНК (pri-miRNA). На следующем этапе pri-miRNA под действием РНКазы III, названной Drosha, совместно с другими факторами превращается в «шпильку» — последовательности длиной в 70 нуклеотидов, называемые pre-miRNA (рис. 1). При помощи экспортина-5 шпилькообразная pre-miRNA попадает в цитоплазму, где под действием другой РНКазы III, названной Dicer, pre-miRNA расщепляется на короткие фрагменты, которые трансформируются в зрелые микро-РНК [4]. В результате образуются двуцепочечные РНК-дуплексы. Эти 21-нуклеотидные РНК вовлечены в разнообразные биологические процессы большинства форм жизни (вирусов, растений, животных и человека). В настоящее время описано более 4000 микро-РНК в 168 видах организмов [5]. Гены этих некодирующих РНК, составляют более чем 1% от всего генома человека и, как считается, регулируют функцию трети всех генов [6].

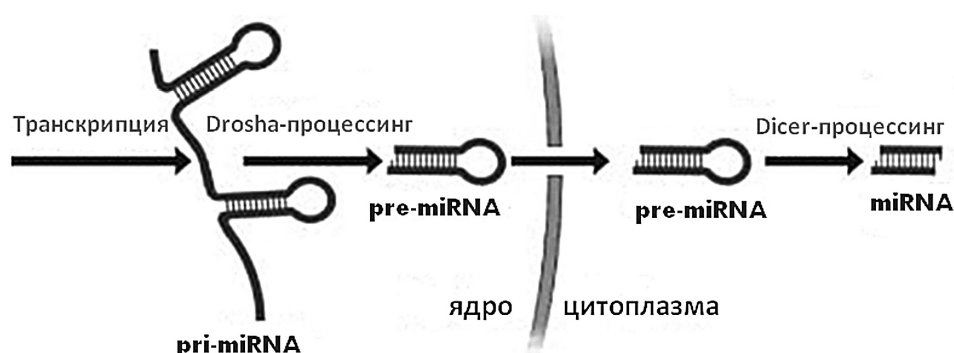
Номенклатура микро-РНК

Номер микро-РНК присваивается в соответствии с их открытием. На вид организма, из которого выделена микро-РНК, в названии указывает приставка из 3-4 букв, например: hsa-miR-101 обозначает, что данная микро-РНК выделена из клеток Homo sapiens. Сформировавшиеся микро-РНК обозначаются «miR», тогда как их предшественники обозначаются «mir». Также в названии фигурирует информация о структурной взаимосвязи различных микро-РНК. Например, hsa-miR-101 у человека и mmi-miR-101 у мышей являются ортологами, то есть идентичны по структуре. Паралогические микро-РНК отличаются по одной или двум нуклеотидным последовательностям, что обозначается дополнительным суффиксом в названии (например, mmi-miR-10a и mmi-miR-10b у мышей). Один ген может давать начало нескольким предшественникам микро-РНК, которые будут различаться в названии цифровым суффиксом (например, dme-mir-281-1 и dme-mir-281-2 в Drosophila melanogaster). Название усложняется и в случае, если различные участки одного предшественника дают начало различным микро-РНК (miR-17-5p и miR-17-3p) [1].

Механизм действия микро-РНК

Микро-РНК регулируют экспрессию генов путем ингибирования трансляции или разрушения специфических транскриптов матричной РНК (мРНК). Посттранскрипционное подавление

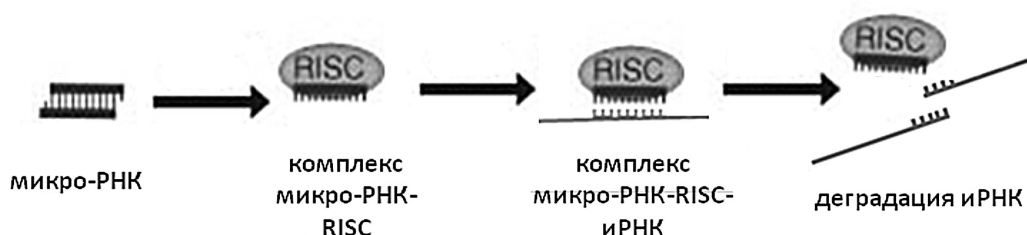
Рисунок 1. Образование микро-РНК



ние экспрессии генов начинается тогда, когда микро-РНК рекрутирует белковый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). Одна из цепей двухцепочечного дуплекса микро-РНК (ведущая цепь) внедряется в белковый комплекс RISC. Данная структура представляет собой комплекс белков, которые способствуют связи микро-РНК с 3' — нетранслируемым концом соответствующей мРНК-мишени [4]. Микро-РНК приводят к разрушению мРНК или подавлению трансляции с таргетной мРНК (рис. 2). При этом они способны подавлять трансляцию посредством различных механизмов: как на этапе инициации, так и в процессе элонгации. Механизм прекращения трансляции также зависит от степени комплементарности связывающихся областей микро-РНК и мРНК. Деградация мРНК включает такие процессы, как деаденилирование, декапирование и экзонуклеарное расщепление молекулы мРНК [7]. Однако до конца механизм действия микро-РНК еще не изучен.

тации, так и метилирования генов, кодирующих микро-РНК [8]. Большинство этих генов локализуется в хрупких сайтах и участках генома, что и объясняет их частую делецию или амплификацию в клетках злокачественных опухолей. В основополагающем исследовании, проведенном группой Croce, было выявлено, что частая делеция участка хромосомы 13q14 в клетках хронического лимфолейкоза приводит к нарушению работы двух микро-РНК: микро-РНК-15а, микро-РНК-16-1 [9]. Эти микро-РНК представляют собой первые микро-РНК онкосупрессоры, которые были открыты при исследовании функций микро-РНК в канцерогенезе. В дальнейшем исследования показали, что нарушение экспрессии микро-РНК в опухолевых клетках является распространенным явлением по сравнению с клетками нормальных тканей [10]. Это определяет необходимость дальнейших исследований изменений, ведущих к формированию опухолевого фенотипа.

Рисунок 2. Механизм действия микро-РНК



Роль микро-РНК при онкологической патологии

Микро-РНК в «здоровых» клетках являются одним из основных регуляторов экспрессии генов, принимающих участие практически во всех процессах ее жизнедеятельности, поведении, размножения и развития. Злокачественные опухоли характеризуются неконтролируемым делением клеток, фенотип которых определяется нарушением экспрессии различных генов. Поэтому неудивительно, что образование микро-РНК часто нарушено в клетках различных опухолей. Аберрантная экспрессия микро-РНК может являться результатом как му-

Классификация опухолей по профилю микро-РНК

Около 4% всех опухолей имеют неясную гистопринadleжность. В здоровом организме профиль экспрессии микро-РНК зачастую имеет тканеспецифичный характер, также он специфичен для фазы развития организма и уровня дифференцировки клеток [10]. Ряд исследований показал различия в экспрессии микро-РНК между опухолевыми и неизменными клетками, при этом в опухоли сохраняется и экспрессия тканеспецифичных микро-РНК [10, 11]. Поэтому микро-РНК могут помочь в определении природы опухолей неясной ги-

стопринadleжности. В одном из исследований образцы 336 первичных и метастатических опухолей были классифицированы по экспрессии 48 микро-РНК, что позволило при «слепом» пересмотре образцов опухолей с уже определенным гистологическим подтипом правильно определить тканевую принадлежность опухоли в 86% случаев, включая 76% метастатических опухолей [12].

Недавно предложена к применению новая классификационная система, основанная на анализе данных экспрессии микро-РНК с помощью вычислительных исследований, называемая SFSSClass [Simultaneous Feature (miRNA) and Sample (tissue) Selection] [13]. Авторы создали данную классификационную технику, основываясь на предшествующих исследованиях. Проведя анализ литературы, посвященной изучению микро-РНК в опухолевой ткани, исследователи смогли определить «модули» микро-РНК с наиболее часто измененной экспрессией в различных опухолях. Было идентифицировано около 100 тканеспецифичных микро-РНК. Авторы применили данный набор микро-РНК для определения органопринадлежности низкодифференцированных опухолей, показав ее более высокую точность в сравнении с использованием мРНК [14].

Таким образом, у микро-РНК имеется значительный потенциал для использования с целью выявления органной принадлежности низкодифференцированных опухолей и метастатических опухолей с невыявленным первичным очагом.

Микро-РНК при некоторых солидных опухолях

Принимая во внимание, что профили экспрессии микро-РНК различаются между клетками нормальных и опухолевых тканей, исследователи поставили вопрос о возможности определения различий между подтипами опухолей и их специфическими онкогенными свойствами по профилю экспрессии микро-РНК. При проведении исследований отмечено, что профиль экспрессии микро-РНК связан с наличием или отсутствием специфических онкогенных мутаций. Обнаружились связи между нарушениями регуляции микро-РНК

и мРНК-мишенями [15]. Все это позволяет распутать некоторые уникальные генные связи.

Рак молочной железы

Рак молочной железы традиционно классифицируется на 4 подтипа: базально-подобный, люминальный А, люминальный В и HER-2 позитивный. Данная классификация основана на различии в экспрессии генов. Выявлено, что ряд микро-РНК неодинаково экспрессируются при базальном и люминальном подтипе рака молочной железы [16]. Эстроген-рецептор положительные опухоли, прогестерон-рецептор положительные опухоли и HER-2/неу-положительные опухоли также различаются профилем экспрессии микро-РНК [17-20].

Некоторые микро-РНК, которые ассоциированы с люминальным или базальным подтипом, отражают их эпителиальную и миоэпителиальную природу, соответственно. К примеру, изменения экспрессии микро-РНК-200 ассоциировано с люминальным подтипом [21].

Члены семейства микро-РНК-200 регулируют поддержание клеткой эпителиального фенотипа путем ингибирования цинковых пальцев генов ZEB1 и ZEB2, которые способствуют эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) — процессу, который определяет способность опухолевых клеток к метастазированию [21]. Низкие значения микро-РНК-200 при базально-подобном подтипе рака молочной железы могут явиться объяснением высокого метастатического потенциала таких опухолей [22]. Кроме этого, представители семейства микро-РНК-200 участвуют в негативной регуляции клеточной инвазии, которая обусловлена сигналами с рецептора эпидермального фактора роста. Поэтому низкая экспрессия микро-РНК-200 ассоциирована с высоким потенциалом опухолевых клеток к инвазии [23].

Также при тройном негативном раке молочной железы отмечается выраженное снижение экспрессии микро-РНК-145 [24]. Данная молекула преимущественно экспрессируется в нормальных миоэпителиальных клетках. Снижение экспрессии микро-РНК-145 определяется в гиперпластических протоках и является одной из причин структурной пере-

стройки миоэпителиальной ткани молочной железы [25].

При введении микро-РНК-145 извне в культуру клеток рака молочной железы отмечается усиление апоптоза опухолевых клеток [26]. Также микро-РНК-145 может подавлять способность клетки к инвазии и метастазированию путем снижения посттранскрипционной экспрессии гена метастазирования — MUC-1 (муцин-1) [27].

Для опухолей молочной железы с метастазами в регионарные лимфоузлы или с высоким пролиферативным индексом характерно повышение экспрессии let-7, что позволяет выделить группу больных с неблагоприятным прогнозом [28]. Ген Let-7 дает начало большому семейству микро-РНК, является одной из первых открытых микро-РНК. Данная молекула участвует в регуляции функций генов *gas* и *c-myc* [46].

Таким образом, в будущем станет возможно с помощью небольшого набора микро-РНК определять подтип рака молочной железы и, более того, предсказывать биологические свойства опухоли. Нужно отметить, что в настоящее время для этого необходимо знать профиль экспрессии сотен мРНК (матричных РНК), что еще более подчеркивает вероятную значимость предиктивных способностей микро-РНК по сравнению с мРНК.

Рак яичников

При раке яичников разными исследовательскими группами по изучению микро-РНК получены отличные друг от друга результаты. В ряде исследований значимая роль при раке яичников отводилась семейству микро-РНК-200. Отмечено, что в клетках рака яичников микро-РНК-200a, микро-РНК-141, микро-РНК-200c и микро-РНК-200b гиперэкспрессированы, тогда как экспрессия микро-РНК-199a, микро-РНК-140, микро-РНК-145 и микро-РНК-125b1 снижена относительно нормальной ткани яичника [29, 30] (таблица 1). Также выявлено, что вследствие гипометилирования в опухолевой ткани яичников отмечается повышение экспрессии таких микро-РНК, как микро-РНК-203, микро-РНК-205 и микро-РНК-21 [29]. Микро-РНК-200a и микро-РНК-200c гиперэкспрессированы в трех гистоло-

гических типах: серозном, эндометриоидном и светлоклеточном раке, тогда как повышение уровня микро-РНК-200b и микро-РНК-141 характерно только для эндометриоидного и серозного гистотипов. Таким образом, авторы с помощью сигнатур микро-РНК предложили не только отличать рак яичников от нормальной ткани, но и дифференцировать светлоклеточный гистологический тип рака яичников от других подтипов [29]. Этими же авторами показано отсутствие различий профиля микро-РНК между опухолями с различной степенью дифференцировки и стадией заболевания. Авторы сделали вывод, что изменение экспрессии микро-РНК играет роль в развитии рака яичников, но не в прогрессировании заболевания.

При раке яичников также отмечена гиперэкспрессия микро-РНК-214, которая, как считают, ассоциирована с резистентностью опухолевых клеток к цисплатину [31]. Более того, механизм действия микро-РНК-214 связан, вероятно, с подавлением трансляции белка PTEN, что приводит к активации Akt сигнального пути. Возможно, с помощью микро-РНК удастся пролить свет на развитие резистентности к препаратам платины у больных раком яичников.

В другом исследовании, проведенном в MSKCC, на архивном материале 62 больных раком яичников определяли сигнатуру микро-РНК. В этой работе получены противоположные данные вышеописанным исследованиям. Не было выявлено гиперэкспрессии представителей семейства микро-РНК-200. С другой стороны, выделено 19 микро-РНК с повышенной экспрессией. Из них только 2 обладало значимым влиянием на выживаемость — микро-РНК-410 и микро-РНК-645. Данный набор из 2 микро-РНК был валидирован на 123 больных. При многофакторном анализе обе микро-РНК оказывали влияние на продолжительность жизни независимо от стадии болезни, степени дифференцировки опухоли, возраста и объема циторедуктивной операции [32]. Медиана продолжительности жизни при высокой экспрессии данных микро-РНК составила 70 месяцев, при низкой экспрессии — 40 месяцев. При анализе возможных патогенетических мишеней для микро-РНК-410 и микро-РНК-645 наибольшее значение придается мРНК генов транскрипционного фактора NF-κB и фермен-

Таблица 1. Микро-РНК при раке яичников

Микро-РНК	Мишень — мРНК гена	Клиническое значение	Ссылка
микро-РНК-200a микро-РНК-200b микро-РНК-200c микро-РНК-141	PTPN12 (для микро-РНК-200b)	Ассоциирована с гистотипом опухоли	29, 30
микро-РНК-214	PTEN	Высокая экспрессия ассоциирована с резистентностью к химиотерапии	31
микро-РНК-410	NF-κB, HDAC1	Высокая экспрессия ассоциирована с низкой выживаемостью	32
микро-РНК-645	NF-κB, HDAC1	Высокая экспрессия ассоциирована с низкой выживаемостью	32

та гистон-деацетилазы (HDAC1), участвующего в эпигенетической регуляции. Таким образом, сделано предположение, что микро-РНК семейства 200 участвуют в процессе канцерогенеза, тогда как микро-РНК-410 и микро-РНК-645, по-видимому, уже отражают биологический характер опухоли.

Другое интересное направление в микро-РНК — определение сигнатур микро-РНК в экзосомах плазмы крови. Экзосомы и эндосомы — органеллы размером 50-100 нм, активно секретирующиеся путем экзоцитоза. Как считается, они играют важную роль в активации Т-лимфоцитов и, вероятно, обладают иммуносупрессивной функцией [33]. Одно из первых исследований, посвященных определению микро-РНК в экзосомах, проводилось на образцах крови больных раком яичников. В сыворотке крови пациенток с различными стадиями рака яичников, а также в крови здоровых женщин и женщин с доброкачественными опухолями яичников определяли уровень циркулирующих экзосом. Было показано, что в сыворотке крови больных раком яичников концентрация экзосом была выше, чем у больных с доброкачественными опухолями и в группе здоровых женщин. Также отмечено, что женщины с более распространенными стадиями болезни имели и более высокие уровни циркулирующих в крови экзосом. Главной целью исследования явилось доказательство того, что микро-РНК, которые гиперэкспрессированы в опухоли, определяются и в циркулирующих в крови экзосомах. Исследователям удалось выявить, что из 218 микро-РНК, определяемых в опухолевой ткани 50 больных, уровень 175 микро-РНК достоверно

не отличался от уровней микро-РНК в циркулирующих в крови экзосомах. Двенадцать микро-РНК определялись в более низких концентрациях в экзосомах, а концентрация 31 микро-РНК была выше в экзосомах по сравнению с опухолевой тканью. Эти микро-РНК не были выявлены в группе контроля и определялись в значительно более низких концентрациях в экзосомах при доброкачественных опухолях яичников. Авторы не уточняют количество больных, у которых отмечалось совпадение по определенным микро-РНК, однако указывают, что наибольшая корреляция между уровнями микро-РНК в опухолевой клетке и в экзосомах была отмечена для 8 микро-РНК: микро-РНК-21, микро-РНК-141, микро-РНК-200a, микро-РНК-200b, микро-РНК-200c, микро-РНК-203, микро-РНК-205, и микро-РНК-214 [34].

Авторы предложили использовать профиль экзосомальных микро-РНК для скрининга в выявлении бессимптомного рака яичников и в выявлении рецидива болезни. Несмотря на предварительный характер результатов исследования, данное сообщение дает надежду на выявление нового биомаркера при раке яичников.

Рак толстой кишки

В процессах канцерогенеза опухолей толстой кишки описано как усиление, так и подавление или полное прекращение экспрессии различных микро-РНК [35-38]. Schetter с коллегами выявили, что ряд микро-РНК (микро-РНК-106a, микро-РНК-181b и микро-

РНК-203) имеют более высокие показатели экспрессии в клетках рака толстой кишки в сравнении с неизменной слизистой оболочки толстой кишки. Но нельзя однозначно утверждать, что данные изменения были ответственны за развитие опухоли, а не были просто ассоциированными с опухолью [39].

В одном из исследований была изучена роль микро-РНК-143 и микро-РНК-21 в 11 образцах аденокарцином толстой кишки и неизменной слизистой оболочки толстой кишки от одних и тех же больных. Отмечено, что среди пациентов моложе 50 лет безотносительно к стадии заболевания чаще наблюдались более низкие показатели экспрессии микро-РНК-143. Тогда как для пациентов старше 50 лет и с более высокой степенью инвазии опухоли и метастазами в лимфоузлы были характерны более высокие уровни микро-РНК-21 [40]. С этого начались публикации большого количества работ, посвященных микро-РНК-21 при раке толстой кишки.

Ингибирование микро-РНК-21 приводит к снижению пролиферации клеток рака толстой кишки, что сопровождалось подавлением экспрессии антиапоптотического гена Bcl-2. Интересно, что при аденомах также отмечена гиперэкспрессия микро-РНК-21 в сравнении с клетками прилегающей неизменной слизистой [41, 42]. С помощью ПЦР анализа определялся уровень экспрессии микро-РНК-21 в 60 образцах рака толстой кишки и 40 образцах нормальной ткани. Выявлено, что повышенный уровень экспрессии микро-РНК-21 в опухоли был ассоциирован с более низкими показателями общей выживаемости ($p=0,043$) [44]. Ранее в предклинических работах сообщалось, что более высокая экспрессия микро-РНК-21 была связана с такими признаками опухоли, как высокий потенциал инвазии, способность к интравазации и метастазированию [45]. Также выявлено, что при воздействии антисмысловых последовательностей микро-РНК-21, подавляющих ее функционирование, пролиферация в клеточных линиях рака толстой кишки с подавлением экспрессии p53 и в линиях, клетки которых экспрессируют мутантный тип p53, не изменялась. В клетках с диким типом p53 наблюдалось снижение пролиферации на 20% после трансфекции антисмысловых последовательностей микро-РНК-21 [44].

В другом исследовании авторы показали, что уровень экспрессии микро-РНК-21 в стромах опухоли повышается с увеличением стадии заболевания. Отмечено, что при высоких значениях микро-РНК-21 в стромах опухоли продолжительность жизни больных раком толстой кишки меньше. Исследователям удалось выделить микро-РНК-21 из парафиновых блоков тканей опухоли 187 больных раком толстой кишки 2 стадии (130 — ободочная кишка, 67 — прямая кишка). В течение 5 лет у 63 пациентов было зарегистрировано прогрессирование болезни. Отмечена статистически значимая обратная взаимосвязь между экспрессией микро-РНК-21 и временем до прогрессирования ($p<0,01$) среди больных раком ободочной кишки, но не раком прямой кишки. По данным многофакторного анализа, данное влияние экспрессии микро-РНК-21 на время до прогрессирования оказалось независимо от других клинических параметров (возраста, пола, общего числа лейкоцитов, статуса гена KRAS и микросателлитной нестабильности). Таким образом, авторам с помощью определения экспрессии микро-РНК-21 в стромах опухоли удалось выявить подгруппу пациентов со 2 стадией рака ободочной кишки, которые имели неблагоприятный прогноз течения болезни [43].

Таким образом, уровень микро-РНК-21 как в опухолевых клетках, так и в стромах опухоли можно рассматривать как потенциальный прогностический биомаркер, позволяющий определить неблагоприятный прогноз у пациентов с диссеминированным раком толстой кишки.

Другой интересной микро-РНК при раке толстой кишки является микро-РНК-106а. Выявлено, что снижение уровня микро-РНК-106а ассоциировано с более низкими показателями времени до прогрессирования и продолжительности жизни больных раком толстой кишки, а также и со стадией заболевания. Микро-РНК-106а действует как опухолевый супрессор, поэтому обратно коррелирует с уровнем экспрессии онкогена E2F1. Снижение уровня микро-РНК-106а ассоциировано с более короткой продолжительностью жизни [45]. Это наблюдение позволяет сделать вывод о возможном использовании определения микро-РНК-106а в качестве прогностического маркера при раке толстой кишки.

Выявлено, что при различных мутациях генов в опухолевых клетках меняется и профиль экспрессии микро-РНК. Так для клеток рака толстой кишки с мутацией генов KRAS и/или BRAF характерно повышение экспрессии таких микро-РНК, как микро-РНК-31, микро-РНК-96, микро-РНК-135 [46]. Роль этих и других микро-РНК при раке толстой кишки представлена в таблице 2.

Кроме вышеописанных локализаций, интересные работы по определению профиля экспрессии микро-РНК в качестве прогностического маркера и маркера, предсказывающего ответ на лечение, проводятся и при других нозологиях. Например, при раке желудка сигнатура 7 микро-РНК может предсказывать общую выживаемость и время до прогрессирования [52]. Также низкий уровень микро-РНК-191 и высокий микро-РНК-193а ассоциированы со значительно более короткой выживаемостью при меланоме [53].

Большое клиническое значение отводится возможности прогнозирования ответа на специфическое лечение. Ряд микро-РНК коррелируют с негативным ответом на специфическое лечение. В различных опухолях экспрессия микро-РНК-21 является индикатором неблагоприятного прогноза [53, 54] и также ассоциирована с плохим ответом на адъювантную терапию при аденокарциномах [42]. Высокие

уровни микро-РНК-125b при раке молочной железы предсказывают отсутствие ответа клеточных линий опухоли при применении таксанов [56]. Аналогичные сообщения представлены и в отношении микро-РНК-21 при раке поджелудочной железы и чувствительностью опухоли к гемцитабину [57].

Эти находки подчеркивают важность этого альтернативного направления в изучении развития резистентности к различным препаратам.

Микро-РНК и лечение

Разработаны различные подходы к применению микро-РНК в терапии опухолей. Первый путь — комбинация стандартной терапии с препаратами, влияющими на экспрессию микро-РНК. К примеру, экспрессия микро-РНК-21 в гемцитабин-резистентных клетках рака поджелудочной железы может уменьшаться под действием аналогов куркумина, приводя к реактивации гена PTEN, являющегося опухолевым супрессором [58]. Также авторы отмечают повышение экспрессии микро-РНК-200с при обработке культуры гемцитабин-резистентных клеток аналогами куркумина, что, возможно, приводит к обратной эпителиально-мезенхимальной трансформации. Это, по мнению авторов, может сопровождаться возвра-

Таблица 2. Некоторые микро-РНК при раке толстой кишки

Ми-РНК	Экспрессия микро-РНК	Мишень — мРНК гена	Биологическое и клиническое значение	Ссылка
микро-РНК-21	Повышена	Bcl-2, TIMP, PDCD4	Ассоциировано с высокой стадией, N+, M1, низкой ОБ, клеточной пролиферацией, васкуляризацией опухоли	42, 44
Let-7	Снижена	RAS, c-мус	Повышение клеточной пролиферации	46
Let-7 g*	Повышена	TGFR-2, RAS, cyclin-D, cytochrome c	Повышение клеточной пролиферации и подавление апоптоза	47, 48
микро-РНК-125b	Повышена	VEFG, VEGFR, IGFR-1	Снижение клеточной пролиферации и ангиогенеза, но ассоциирована с резистентностью к терапии	49
микро-РНК-137	Повышена	TGF2I	Поддержание опухолевого фенотипа	49
микро-РНК-34а	Снижена	E2F, p53	Ингибирование клеточного роста	50
микро-РНК-106а	Снижена	E2F	Ассоциировано с более высокой стадией, снижением ВДП и ОБ	45, 51

*Let-7 g — представитель семейства микро-РНК let-7, ОБ — общая выживаемость, ВДП — время до прогрессирования.

щением чувствительности к гемцитабину [59]. Таким образом, комбинация стандартной терапии с препаратами, влияющими на экспрессию микро-РНК, может быть эффективной стратегией при лечении злокачественных опухолей.

Второе направление — применение антисмысловых последовательностей микро-РНК (анти-микро-РНК). Антисмысловая последовательность — короткая однонитевая последовательность нуклеотидов, комплементарная молекуле микро-РНК. После связывания с нуклеотидной последовательностью микро-РНК последняя не может распознавать свою мишень — мРНК, в результате чего возобновляется синтез белка с мРНК-мишени. Первое сообщение о терапевтическом применении антисмысловых микро-РНК появилось в начале 2008 года [60]. Анти-микро-РНК, конъюгированные с холестерином, обладают способностью ингибировать микро-РНК *in vivo* в организмах мышей. Введение таких антисмысловых олигонуклеотидов эффективно ингибирует зрелые микро-РНК в печени в течение 23 дней. Ингибирование микро-РНК-21 и микро-РНК-200b привело к увеличению чувствительности клеток холангиоцеллюлярного рака к гемцитабину, а снижение экспрессии микро-РНК-141 — к подавлению клеточного роста [61]. В другом исследовании введение антисмысловых последовательностей микро-РНК-16 (часто экспрессирована при различных опухолях) приводит к полному исчезновению микро-РНК-16 во всех тканях у мышей, за исключением головного мозга [62].

Третий путь применения микро-РНК в терапии опухолей — использование самих микро-РНК для подавления опухолевого роста. Scott с соавторами удалось снизить инвазию и миграцию клеток рака молочной железы с помощью микро-РНК-125 [63].

Четвертым путем воздействия на экспрессию микро-РНК может служить применение других эпигенетических механизмов — модификация гистонов или метилирование ДНК. Так, при раке яичников гипометилирование ДНК ответственно за гиперэкспрессию микро-РНК-21, микро-РНК-203 и микро-РНК-205 [29]. В будущем такие препараты, как ингибиторы деацетилазы гистонов и деметилирующие агенты, могут быть применены для восстановления экспрессии соответствующих микро-

РНК, что приведет к реверсии опухолевого фенотипа в фенотип нормальной клетки.

Таким образом, перед онкологами открывается большое перспективное направление в терапии онкологических заболеваний.

Перспективы и ограничение применения микро-РНК в онкологии

Доказана возможность первичной идентификации микро-РНК с помощью определения широкого спектра профиля экспрессии генов. Этот подход значительно упростился в результате внедрения таких новых методов, как микро-чипирование микро-РНК, высокоэффективное глубокое секвенирование и цитофлуориметрический анализ с сортировкой клеток на бусах [64, 65]. С помощью данных методов расширился спектр микро-РНК, выявляемых в опухолевых клетках. Таким образом, для расшифровки сложной сети взаимосвязей патогенетических путей в опухолевых клетках рекомендуется совместное определение профиля экспрессии генов микро-РНК и мРНК параллельно с изучением модели экспрессии транскрипционных факторов [67]. Тем не менее, среди различных методов генетической диагностики применение методов по определению сигнатур микро-РНК имеет ряд преимуществ над методами по определению профилей экспрессии традиционной мРНК, так как стабильность образцов с микро-РНК выше, чем мРНК [66].

Несмотря на все преимущества применения микро-РНК в клинической практике, в настоящий момент имеются следующие ограничения. Так, Blenkiron с соавторами сообщили о низком соответствии результатов своих исследований по взаимоотношению экспрессии микро-РНК и цитоморфологических факторов с результатами предшествующих исследований [17]. Такие различия обычно обусловлены особенностями опухолевого материала или методов подготовки препарата, дизайном эксперимента и/или анализом данных [68]. Кроме этого, использование различных методов для нормализации данных может объяснять некоторую вариабельность в результатах различных исследований [69]. Другим объяснением таких несоответствий между исследовательскими группами может являть-

ся возможность быстрого изменения уровня микро-РНК при стрессе и гипоксии [70, 71], так как время взятия и транспортировки материала могут влиять на уровень микро-РНК.

Использование микро-РНК в качестве биомаркера, который способен предсказывать риск развития рака, является еще более значимым, так как в настоящее время таких известных маркеров очень мало. Некоторые исследователи сообщили, что уровень экспрессии некоторых микро-РНК может отличаться между представителями различных этнических групп и при различных опухолях [72]. Поэтому рекомендуется валидировать, полученные данные об экспрессии микро-РНК на больных со сходными характеристиками.

Тем не менее, результаты недавних исследований вселяют оптимизм. И в настоящее время первичной целью является всесторонняя валидация полученных результатов и унификация методов выделения микро-РНК, что позволит внедрить анализ микро-РНК в диагностику и лечение онкологических заболеваний.

Литература

- Ambros V., Bartel B., Bartel D.P. et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. — 2003, 9: 277-279.
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. — 2004, 14, 1902-1910.
- Kim Y.K., Kim V.N. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. — 2007, 26, 775-783.
- Kutter C., Svoboda P. Meeting report: miRNA, siRNA, piRNA. Knowns of the unknown. *RNA Biology*; October/November/December. — 2008, 5:4, 181-188.
- <http://www.mirbase.org>
- Hatfield S., Ruohola-Baker H. MicroRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res*. — 2008, 331, 57-66.
- Wu L., Fan J., Belasco J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2006, 103, 4034-4039.
- Lujambio A., Calin G. A., Villanueva A. et al. A micro RNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* — 2008, 105, 13556-13561.
- Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* — 2002, 99, 15524-15529.
- Lu J., Getz G., Miska E. A. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. — 2005, 435, 834-838.
- Volinia S., Calin G. A., Liu C. G. et al. A micro RNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* — 2006, 103, 2257-2261.
- Rosenfeld N., Aharonov R., Meiri E. et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol*. — 2008, 26, 462-469.
- Mitra R., Bandyopadhyay S., Maulik U., Zhang M. Q. et al. SFSS Class: an integrated approach for miRNA based tumor classification. *BMC Bioinform*. — 2010, 11 (Suppl.1), S22.
- Bandyopadhyay S., Mitra R., Maulik U., Zhang M. Q. et al. Development of the human cancer microRNA network. *Silence*. — 2010, 1, 6.
- O'Day E. and Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*. — 2010, 12, 201
- Sotiriou C. and Puzstai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med*. — 2009, 360, 790-800.
- Blenkiron C., Goldstein L. D., Thorne N. P. et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. — 2007, 8, R214.
- Mattie M. D., Benz C. C., Bowers J. et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol. Cancer*. — 2006, 5, 24.
- Lowery A. J., Miller N., Devaney A. et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*. — 2009, 11, R27.
- Iorio M. V., Ferracin M., Liu C. G. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. — 2005, 65, 7065-7070.
- Park S. M., Gaur A. B., Lengyelet E. et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*. — 2008, 22, 894-907.
- Baffa R., Fassan M., Volinia S. et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J. Pathol*. — 2009, 219, 214-221.
- Uhlmann S., Zhang J. D., Schwäger A. et al. miR-200bc/429 cluster targets PLC gamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene*. — 2010, 29, 4297-4306.
- Sachdeva M. and Mo Y. Y. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am. J. Transl. Res*. — 2010, 2, 170-180.
- Sempere L. F., Christensen M., Silahtaroglu A. et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell

- subpopulations in breast cancer. *Cancer Res.* — 2007, 67, 11612-11620.
26. Spizzo R., Nicoloso M. S., Lupini L. et al. miR-145 participates with TP53 in a death- promoting regulatory loop and targets estrogen receptor- α in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* — 2010, 17, 246-254.
 27. Sachdeva M. and Mo Y.Y. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.* — 2010, 70, 378-387.
 28. Yu F., Yao H., Zhu P. et al. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell.* — 2007, 131, 1109-1123.
 29. Iorio M.V., Visone R., Di Leva G. et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res Sep.* 15. — 2007; 67 (18): 8699-707.
 30. Hu X., Macdonald D.M., Huettner P.C. et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol Sep.* — 2009; 114 (3):457-64.
 31. Yang H., Kong W., He L. et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res.* — 2008; 68: 425-33.
 32. Shih K.K., Qin L.X., Tanner E. J. et al. A microRNA survival signature (MiSS) for advanced ovarian cancer, *Gynecol Oncol.* 121 (2011) 444-450.
 33. Mathivanan S., Ji H., Simpson R. J. et al. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics.* 73 (2010), 1907-1920.
 34. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gyn Oncol.* — 2008; 110: 13-21.
 35. Aslam M.I., Taylor K., Pringle J.H., Jameson J.S.. MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer. *Br J Surg.* — 2009; 96: 702-10.
 36. Slaby O., Svoboda M., Fabian P. et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology.* — 2007; 72: 397-402.
 37. Faber C., Kirchner T., Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch.* — 2009; 454: 359-67.
 38. Tang J.T., Fang J.Y. MicroRNA regulatory network in human colorectal cancer. *Mini Rev Med Chem.* — 2009; 9: 921-6.
 39. Schetter A. J., Harris C. C. Plasma microRNAs: a potential biomarker for colorectal cancer? *Gut.* — 2009; 58: 1318-9.
 40. Biscaglia G., Panza A., Gentile A. M. et al. Role of microRNA in the pathogenesis of colorectal cancer: possible involvement of miRNA-143 and miRNA-21. *Abstracts/Digestive and Liver Disease 41S* (2009), S1 — S167.
 41. Rossi S., Kopetz S., Davuluri R. et al. MicroRNAs, ultraconserved genes and colorectal cancers. *Int J Biochem Cell Biol.* — 2010 Aug; 42 (8):1291-7
 42. Schetter A. J., Leung S. Y., Sohn J. J. et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama.* — 2008; 299: 425-36.
 43. Nielsen B. S., Jorgensen S., Fog J. et al. MicroRNA-21 is expressed in stroma of colorectal cancers and high levels identified by image analysis predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients. *EJC supplements* 8, no. 5 (2010) 5-81.
 44. Slaby O., Hrstka R., Sobkova K. et al. Knockdown of oncogenic microRNA-21 displays cytotoxicity in p53 wild-type colon cancer cells. 07 July 2008 abs. 306, p.78.
 45. Slaby O., Svoboda M., Fabian P. et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology.* — 2007; 72: 397-402.
 46. Akao Y., Nakagawa Y., Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull.* — 2006; 29: 903-6.
 47. Xi Y., Shalgi R., Fodstad O., Pilpel Y., Ju J. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin Cancer Res.* — 2006; 12: 2014-24.
 48. Nakajima G., Hayashi K., Xi Y. et al. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7 g and hsa-miR-181b are associated with chemoresponse to S-1 in colon cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* — 2006; 3: 317-24.
 49. Svoboda M., Izakovicova Holla L., Seř R. et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol.* — 2008; 33: 541-7.
 50. Tazawa H., Tsuchiya N., Izumiya M., Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2007; 104: 15472-7.
 51. Diaz R., Silva J., Garcia J. M. et al. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* — 2008; 47: 794-802.
 52. Li X., Zhang Y., Zhang Y. et al. Survival prediction of gastric cancer by a seven- microRNA signature. *Gut.* — 2010, 59, 579-585.
 53. Caramuta S., Egyházi S., Rodolfo M. et al. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* — 2010, 130, 2062-2070.

54. Rossi S., Shimizu M., Barbarotto E. et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. — 2010, 116, 945-952.
55. Dillhoff M., Liu J., Frankel W., Croce C. et al. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J. Gastrointest. Surg.* — 2008, 12, 2171-2176.
56. Zhou M., Liu Z., Zhao Y. et al. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer1 (Bak1) expression. *J. Biol. Chem.* — 2010, 285, 21496-21507.
57. Giovannetti E., Funel N., Peters G. J. et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res.* — 2010, 70, 4528-4538.
58. Ali A., Ahmad A., Banerjee S. et al. Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer Res.* — 2010, 70, 3606.
59. Yu J., Ohuchida K., Mizumoto K. et al. MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol. Cancer*. — 2010, 9, 169.
60. Elmén J., Lindow M., Schütz S., et al. LNA mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. — 2008; 452: 896-9.
61. Meng F., Henson R., Lang M. et al. Involvement of human microRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. — 2006; 130: 2113.
62. Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R. et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. — 2005, 438: 685-689.
63. Scott G. K., Goga A., Bhaumik D. et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125 or miR-125b. *J Biol Chem*. — 2007; 282: 1479.
64. Liu C. G., Calin G. A., Meloon B. et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* — 2004, 101, 9740-9744.
65. Margulies M., Egholm M., Altman W. E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. — 2005, 437, 376-380.
66. Jung M., Schaefer A., Steiner I. et al. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin. Chem.* — 2010, 56, 998-1006.
67. Chan E., Vez Prado D. E. and Weidhaas J. B. Cancer microRNAs: From subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends in Molecular Medicine*. Volume 17, Issue 5, 235-243, 28 February. — 2011.
68. Xu J. Z. and Wong C. W. Hunting for robust gene signature from cancer profiling data: sources of variability, different interpretations, and recent methodological developments. *Cancer Lett.* — 2010, 296, 9-16.
69. Peltier H. J. and Latham G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. — 2008, 14, 844-852.
70. Marsit C. J., Eddy K. and Kelsey K. T. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res.* — 2006, 66, 10843-10848.
71. Kulshreshtha R., Ferracin M., Wojcik S. E. et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* — 2007, 27, 1859-1867.
72. Yazici H., Terry M. B., Cho Y. H. et al. Investigation of the miR16-1 (C > T) +7 substitution in even different types of cancer from three ethnic groups. *Journal of Oncology*. Volume 2009, Article ID 827532, 4 p.