

СКРИПКІНА І. Я.<sup>✉</sup>, ОНИЩЕНКО К. В., ГЕРАСИМЧУК Д. О., АНОПРІСНКО О. В.,  
АРЕШКОВ П. О.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

<sup>✉</sup> [i.skrypkina@imbg.org.ua](mailto:i.skrypkina@imbg.org.ua)

### АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ міРНК hsa-miR-30a-5p ТА hsa-miR-200c-3p У ПУХЛИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

**Мета.** Незважаючи на успіхи науковців та лікарів усього світу, гліобластома залишається найбільш агресивною пухлиною головного мозку із вкрай низьким прогностичним потенціалом для пацієнта. Пошук маркерів, що можуть допомогти у визначенні прогнозу, а отже, і у виборі стратегії лікування, залишається наразі вкрай актуальною проблемою. Багаторічні дослідження наукових груп у всьому світі підтверджують правомірність використання мікроРНК як достовірних маркерів для діагностики та прогнозування новоутворень, зокрема пухлин головного мозку. Метою нашого дослідження є пошук мікроРНК, зміна експресії яких у гліомах може бути достовірно асоційована зі ступенем і прогресією пухлин. **Методи.** Для досягнення мети були використані такі методи: біоінформатичний пошук міРНК до 3'-UTR генів, експресія яких пов'язана з розвитком гліом, виділення РНК та синтез мікроРНК-специфічних кДНК. Експресію міРНК визначали шляхом методу кількісної ПЛР (кПЛР) у реальному часі. **Результати.** Аналіз результатів кПЛР показав зниження концентрації miR-30a-5p і miR-200c-3p у пухлинах мозку відносно прилеглої до неї нормальної тканини в середньому у 5 та 5,8 разів відповідно ( $p < 0,0001$ ). Площа під ROC-кривою для miR-30a-5p становить  $AUC=0,8528$ , для miR-200c-3p –  $AUC=0,808$ . **Висновки.** Рівень експресії hsa-miR-30a-3p та hsa-miR-200c-3p має хороший діагностичний потенціал ( $AUC=7-9$ ) для використання в якості додаткового діагностичного маркера під час визначення сигнатури гліобластоми.

**Ключові слова:** гліобластома, мікроРНК, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-200c-3p.

Одним із механізмів регуляції продукції генів є інгібування трансляції їх мРНК за допомогою специфічних мікроРНК. У випадках багатьох ракових захворювань розвиток хвороби

пов'язаний зі змінами профілю експресії мікроРНК, необхідними для регуляції численних клітинних процесів [1], зокрема контролю клітинної проліферації, диференціації та тривалості життя клітини [1–5].

МікроРНК – клас коротких некодуючих регуляторних РНК, які діють як посттранскрипційні регулятори експресії генів [6–8]. Зв'язуючись із 3'-нетрансльованою ділянкою цільових мРНК, мікроРНК можуть викликати трансляційну регуляцію і/або підвищувати деградацію мРНК генів-мішеней [9]. МікроРНК беруть участь у різноманітних біологічних процесах, що, зокрема, пов'язані з розвитком, диференціацією, проліферацією клітин та апоптозом. Проте залишається невідомим, чи є змінена експресія мікроРНК причиною або наслідком патологічних процесів. Хоча біоінформатичні підходи дозволяють передбачати тисячі генів, які потенційно регулюються мікроРНК на основі комплементарності та еволюційної консервативності послідовностей мікроРНК та мРНК-мішеней, однак регуляцію лише невеликої частини генів-мішеней за допомогою мікроРНК підтверджено функціонально.

Роль мікроРНК у розвитку мультиформної гліобластоми (GBM) була запропонована Ciafre S.A та співавт., які вивчали глобальну експресію 245 мікроРНК в GBM методом мікрочипів [10]. У результаті використання мікрочипів різними групами дослідників було визначено низку мікроРНК, експресія яких значно змінюється в пухлинах порівняно з сусідніми нормальними ділянками мозку від одного і того ж пацієнта. Такі пошуки продовжувалися, в результаті чого різними групами дослідників було визначено низку мікроРНК, що потенційно впливають на дезрегуляцію генів у гліобластомах [11]. Вищезгадані дослідження свідчать про великий потенціал для використання профілю мікроРНК як потужного діагностичного та про-

---

© СКРИПКІНА І. Я., ОНИЩЕНКО К. В., ГЕРАСИМЧУК Д. О., АНОПРІСНКО О. В.,  
АРЕШКОВ П. О.

гностичного маркера для визначення сигнатури астроцитом, а також вказують на можливе використання мікроРНК в якості мішеней таргетної терапії для нової стратегії лікування GBM.

### Матеріали і методи

Для дослідження використовували зразки пухлин і умовно нормальної тканини головного мозку з колекції лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАН України, які отримували з Інституту нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова (м. Київ, Україна) протягом 1998–2012 рр. у рамках спільних досліджень. Однак зразки нормальної тканини головного мозку не можна вважати нормальними у загальноприйнятному значенні, оскільки вони часто є «умовно» нормальними, їх отримують видаленням прилеглої частини пухлини. Всі зразки були отримані за згоди пацієнтів. Хворі до оперативного втручання були дообстежені в повному обсязі, відповідно до протоколів Міністерства охорони здоров'я: лабораторно-клінічні аналізи, променеві методи дослідження (ультразвукова діагностика, магніто-резонансна томографія).

Виділення РНК та геномної ДНК проводили за допомогою TRI Reagent (Sigma-Aldrich, США), відповідно до рекомендацій виробника. Зворотну транскрипцію здійснювали за допомогою набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США), згідно з відповідним протоколом. Для цього спочатку суміш виділеної попередньо тотальної РНК піддавалася поліаденілюванню, після чого із початком синтезу першого ланцюга кДНК зразки негайно поміщалися на лід. Отриману кДНК розчиняли в 280 мкл вільної від РНКаз води та зберігали за  $-20^{\circ}\text{C}$  до використання у ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) у реальному часі.

Для визначення концентрації miR-30a-5p та miR-200c-3p в біоматеріалах була задіяна кількісна ПЛР у реальному часі. Для її проведення використовували: 3 мкл 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Естонія); 7,5 мкл деіонізованої води; 3 мкл розчину кДНК, синтезованого на попередньому етапі; 0,75 мкл 5 мікромолярних праймерів до відповідних міРНК. R18S була обрана як референсна РНК, відносно якої вимірювалася концентрація досліджуваних міРНК. Прямий праймер до R18S мав таку послідовність: 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAA TTC-3'; зворотний: 5'-CATCTTGGCAAATGCTTTTCG-3'; прями

ий праймер до мікроРНК: miR-30a-5p 5'-TG TAAACATCCTCGACTGGAAGCC-3'; до miR-200c-3p 5'-ТААТАCTGCCTGGTAATGAT GC-3'. Для міРНК залучався універсальний зворотний праймер із набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США).

ПЛР у реальному часі проходила за таких умов: 15 хв за  $95^{\circ}\text{C}$  для активації полімерази; 15 с за  $95^{\circ}\text{C}$  для денатурації кДНК; 20 с за  $60^{\circ}\text{C}$  для анеалінгу праймерів, 20 с за  $72^{\circ}\text{C}$  для елонгації; останні три етапи повторювалися 40 разів. Після завершення для отримання кривих плавлення продуктів зразки підігрівалися з кроком  $0,5^{\circ}\text{C}$  до  $95^{\circ}\text{C}$ . Реакції для кожного зразка ставилися у 3-х повторях.

Рівень експресії мікроРНК miR-30a-5p та miR-200c-3p 1 визначали за відношенням до рівня експресії гена R18S в пробі. Величини розраховувалися за формулою  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , де  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{міРНК}} - \Delta\text{Ct}_{\text{R18S}}$ . Після цього проводився порівняльний аналіз відносних величин у досліджуваних зразках, вимірювання в умовних одиницях (у. о.). Для оцінки статистичної значущості відмінностей між групами визначався непараметричний тест Манн-Уїтні з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software, Ла Джолла, СА, США) та за допомогою Microsoft Excel 2007. Відмінності вважалися статистично значущими, якщо  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Оскільки послідовність мікроРНК не повністю комплементарна до послідовності мРНК-мішені, мікроРНК можуть інгібувати трансляцію із кількох різних мРНК, що містять схожі послідовності. Крім того, 3'-нетрансльовані ділянки мРНК (3'-untranslated region, 3'-UTR) можуть мати декілька сайтів для можливості зв'язування як з однією тією ж самою мікроРНК, так і з різними міРНК. МікроРНК, зв'язуючись із мРНК-мішенню, можуть мати різну силу взаємодії і різну силу інгібування трансляції. Водночас відомо, що рівень експресії деяких міРНК пов'язаний не тільки з пригніченням трансляції генів, але й зі збільшенням їхньої продукції.

Наша робота спрямована, в першу чергу, на пошук генів, зміна продукції яких часто відбувається у гліомах різного ступеня злоякісності, з метою визначення сигнатури різних типів злоякісних пухлин головного мозку. Такі гени

також можуть характеризувати стійкість до хеміо- та радіорезистентності злоякісних пухлин головного мозку. Аналіз отриманих результатів допоможе у визначенні маркерних генів, що пов'язані з поганим прогнозом для пацієнтів із гліобластомами. Зміна продукції таких генів може бути пов'язана, в свою чергу, зі зміною деяких чинників, що впливають на експресію цих генів, зокрема мікроРНК.

Для визначення сайтів-мішеней у 3'-UTR мРНК досліджуваних нами генів (*MGMT*, *TSC22D1*, *RUNX3*, *SOX2*, *CH13L1* та *CH13L2*) використовували біоінформатичні онлайн-ресурси TargetScan та DIANA. Оскільки ці ресурси використовують різні алгоритми пошуку, а також тому, що міРНК для зв'язування з мРНК не завжди має 100 % гомології з сайтом-мішенню, у процесі біоінформатичного аналізу обома серверами визначалися різні набори мікроРНК для одного й того ж набору генів. Тим не менше, обидва ресурси ідентифікували спільні мікроРНК для досліджуваних генів-мішеней, хоча й із різним рівнем достовірності зв'язування з мРНК того чи іншого гена-мішені.

Отримані за допомогою обох ресурсів масиви передбачуваних мікроРНК порівнювалися між собою для подальшого визначення мікроРНК, що траплялися в обох групах. У результаті проведеного аналізу було вибрано мікроРНК, що передбачаються як регулятори експресії для декількох із досліджуваних генів (табл.).

Для подальшого дослідження було вибрано мікроРНК hsa-miR-30a-5p та hsa-miR-200c-3p, що можуть регулювати транскрипцію мРНК генів *CH13L1*, *MGMT*, *SOX2* та *TSC22D1*.

На сьогодні існують дані про можливу роль членів родини miR-30a у патогенезі пухлин [11], у тому числі, зв'язок із хронічною лімфоцитарною лейкемією (CLL) [12], раком легенів [13], раком товстої кишки [14].

Для hsa-miR-200c раніше була показана участь у розвитку нервової системи і можливий зв'язок із нейропсихічними розладами за регуляції експресії [15, 16]. Відомо, що miR-200-3p також відіграє важливу роль у розвитку багатьох видів раку шляхом регулювання клітинної диференціації, проліферації, інвазії, міграції тощо [16–19]. Крім того, Wilczynski і співавт. показали, що більш низькі рівні експресії мікроРНК-200c були пов'язані з поганим виживанням пацієнтів з ендометріоїдним раком ендометрію [20].

Аналіз результатів проведеної нами кількісної ПЛР у реальному часі показав статистично достовірне зниження експресії як miR-30a-5p, так і miR-200c-3p у гліальних пухлинах відносно прилеглої до неї нормальної тканини (рис. 1).

Експресія miR-30a-5p була знижена у пухлинах у порівнянні з прилеглими тканинами в середньому у 5 разів ( $p < 0,0001$ ). Подібні результати були отримані і у ході вивчення міРНК miR-200c-3p, яка була знижена у гліобластомах (порівняно з показниками в прилеглих умовно здорових тканинах) у середньому у 5,8 разів ( $p < 0,0001$ ) (рис. 2).

Аналіз побудованої ROC-кривої (рис. 2 А) для результатів експресії мікроРНК miR-30a-5p показав велике значення площі під нею ( $AUC=0,8528$ ), що вказує на достовірну різницю значень між експресією miR-30a-5p у пухлинах та умовно нормальних тканинах і на достатньо хороший діагностичний потенціал цього маркера.

Для miR-200c-3p перекриття значень експресії, отриманих для пухлинних і контрольних тканин, були меншими, ніж для miR-30a-5p, що підтверджує ROC-аналіз і визначена площа під кривою ( $AUC=0,808$ ). Отже, miR-200c-3p має більший діагностичний потенціал у порівнянні з експресією miR-30a-5p (рис. 2 В).

Таблиця. МікроРНК, що здатні регулювати декілька з досліджуваних генів (за даними біоінформатичного аналізу за допомогою ресурсів TargetScan та DIANA)

міРНК	3'- UTR мРНК генів			
	<i>CH13L1</i>	<i>MGMT</i>	<i>SOX2</i>	<i>TSC22D1</i>
hsa-miR-30a-5p	+	+	-	-
hsa-miR-200b-3p	-	-	+	+
hsa-miR-200c-3p	+	-	+	+

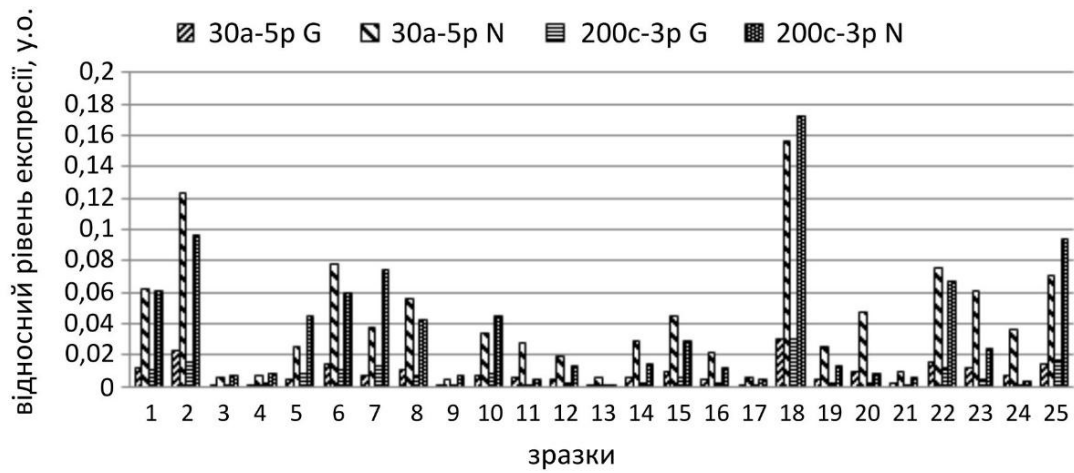


Рис. 1. Відносні рівні експресії мікроРНК hsa-miR-30a-5p та hsa-miR-200c-3p у біопсіях гліом (G) та прилеглих тканин (N) хворих.

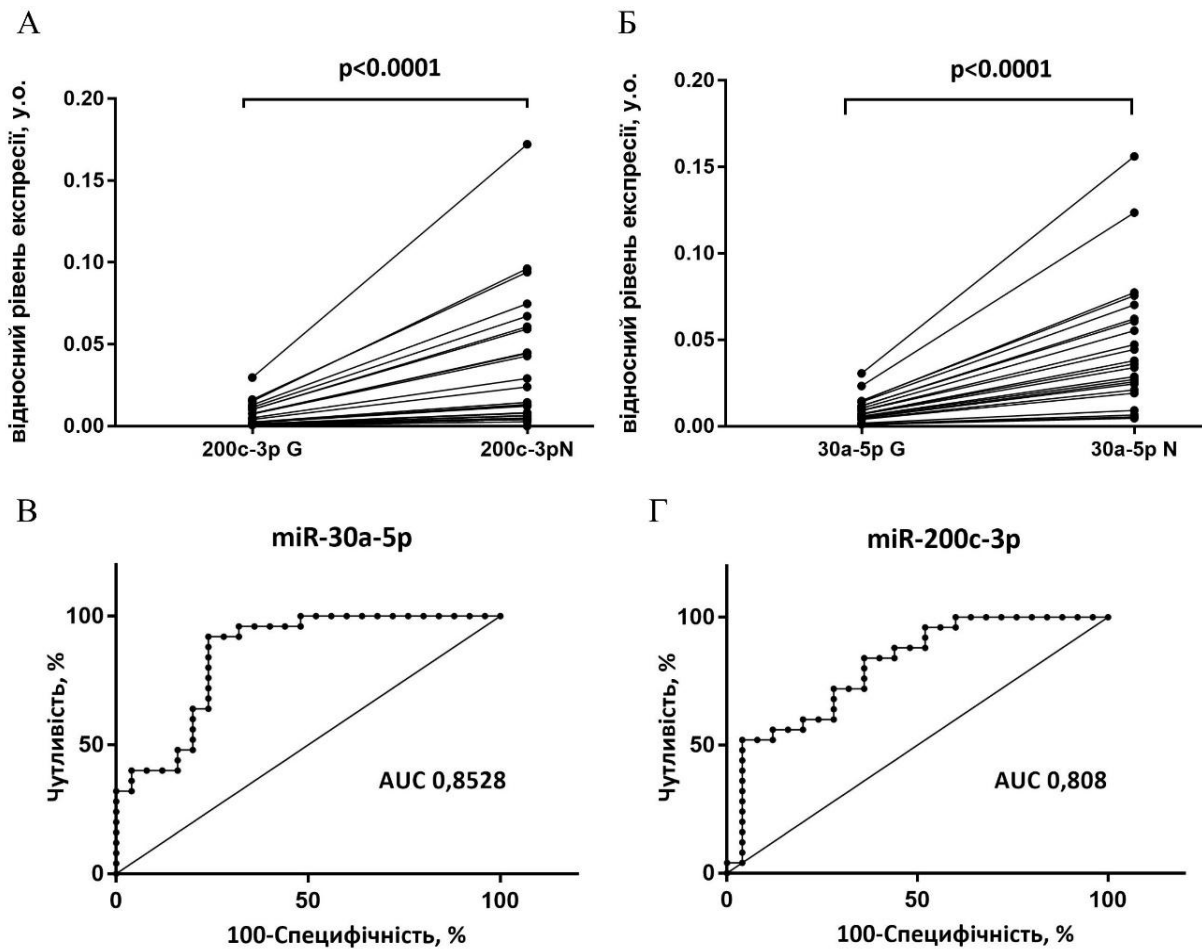


Рис. 2. Аналіз рівнів концентрації мікроРНК у пухлинах гліабластом (G) та прилеглих тканин (N) (А, Б). Аналіз ROC-кривої концентрацій міРНК miR-30a-5p (В) та miR-200c-3p (Г) у пухлинах пацієнтів (у порівнянні з контрольними прилеглими тканинами).

Перекриття значень рівнів експресії міРНК для зразків гліобластом та контрольних прилеглих тканин може пояснюватися як попаданням малігнізованих клітин у прилегли ділянки, так і впливом секретованих речовин із клітин пухлини і їх впливом на непухлинне оточення.

### Висновки

Наші результати вказують на те, що рівень hsa-miR-30a-5p та hsa-miR-200c-3p помітно знижений у зразках гліом, що може слугувати

біомаркером для діагностики та/або прогнозування злоякісності гліоми. Безперечно, необхідні подальші дослідження для з'ясування функції та механізму дії досліджуваних мікроРНК, що беруть участь у розвитку і прогресії гліоми і, можливо, можуть бути потенційною терапевтичною мішенню для лікування онкохворих.

Публікація містить результати досліджень, проведених за грантової підтримки за конкурсними проектами 0117U003595 та 115U002951 Національної академії наук України.

### References

- MacFarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Current Genomics*. 2010. Vol. 11. P. 537–561. doi: 10.2174/138920210793175895.
- Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006. Vol. 6. P. 259–269. doi: 10.1038/nrc1840.
- Hwang H.W., Mendell J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. 2006. Vol. 94. P. 776–780. doi: 10.1038/sj.bjc.6603023.
- Dalmay T., Edwards D.R. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. 2006. Vol. 25. P. 6170–6175. doi: 10.1038/sj.onc.1209911.
- Esau C., Davis S. Murray S.F., Yu X.X., Pandey S.K., Pear M., Watts L., Booten S.L., Graham M., McKay R., Subramaniam A., Propp S., Lollo B.A., Freier S., Bennett C.F., Bhanot S., Monia B.P. MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metabolism*. 2006. Vol. 3. P. 87–98. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.005.
- Lee R.C., Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001. 294. P. 862–864. doi: 10.1126/science.1065329. doi: 10.1126/science.1065329.
- Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001. Vol. 294. P. 858–862. doi: 10.1126/science.1065062.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001. Vol. 294. P. 853–858. doi: 10.1126/science.1064921.
- Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009. Vol. 136. P. 215–233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Ciafrè S.A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C.G., Sabatino G., Negrini M., Maira G., Croce C.M., Farace M.G.. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. Vol. 334. P. 1351–1358. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.030.
- Wang K., Jia Z., Zou J., Zhang A., Wang G., Hao J., Wang Y., Yang S., Pu P. Analysis of hsa-miR-30a-5p expression in human gliomas. *Pathol Oncol Res*. 2013. Vol. 19. P. 405–411. doi: 10.1007/s12253-012-9593-x.
- Calin G.A., Liu C.G., Sevignani C., Ferracin M., Felli N., Dumitru C.D., Shimizu M., Cimmino A. Zupo S., Dono M., Dell'Aquila M.L., Alder H., Rassenti L., Kipps T.J., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. Vol. 101. P. 11755–11760. doi: 10.1073/pnas.0404432101.
- Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C.C., Croce C.M. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. Vol. 103. P. 2257–2261. doi: 10.1073/pnas.0510565103.
- Schetter A.J., Leung S.Y., Sohn J.J., Zanetti K.A., Bowman E.D., Yanaihara N., Yuen S.T., Chan T.L., Kwong D.L., Au G.K., Liu C.G., Calin G.A., Croce C.M., Harris C.C. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama*. 2008. Vol. 299. P. 425–436. doi: 10.1001/jama.299.4.425.
- Gardiner E., Beveridge N.J., Wu J.Q., Carr V., Scott R.J., Tooney P.A., Cairns M.J. Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Psychiatry*. 2012. Vol. 17. P. 827–840. doi: 10.1038/mp.2011.78.
- Belzeaux R., Bergon A., Jeanjean V., Lloriod B., Formisano-Tréziny C., Verrier L., Loundou A, Baumstarck-Barrau K, Boyer L, Gall V, Gabert J, Nguyen C, Azorin JM, Naudin J, Ibrahim EC. Responder and nonresponder patients exhibit different peripheral transcriptional signatures during major depressive episode. *Transl Psychiatry*. 2012. 2. e185. doi: 10.1038/tp.2012.112.
- Wei J., Zhang Y., Luo Y., Wang Z., Bi S., Song D., Dai Y., Wang T., Qiu L., Wen L., Yuan L., Yang J.Y. Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgfb1/2, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*. 2014. Vol. 67. P. 91–102. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.811.
- Vilming Elgaaen B., Olstad O.K., Haug K.B., Brusletto B., Sandvik L., Staff A.C., Gautvik K.M., Davidson B. Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian carcinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker. *BMC Cancer*. 2014. Vol. 14. P. 80. doi: 10.1186/1471-2407-14-80.

19. Roh M.S., Lee H.W., Jung S.B., Kim K., Lee E.H., Park M.I., Lee J.S., Kim M.S. Expression of miR-200c and its clinicopathological significance in patients with colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2018. Vol. 214. P. 350–355. doi: 10.1016/j.prp.2018.01.00.
20. Wilczynski M., Danielska J., Domanska-Senderowska D., Dzieciecka M., Szymanska B., Malinowski A. Association of miRNA-200c expression levels with clinicopathological factors and prognosis in endometrioid endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018. Vol. 97. P. 560–569. doi: 10.1111/aogs.13306.

**SKRYPKINA I. Ya., ONYSHCHENKO K. V., GERASYMCHUK D. O., ANOPRIYENKO O. V., ARESHKOV P. O.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: i.skrypkina@imbg.org.ua*

#### **ANALYSIS OF hsa-miR-30a-5p AND hsa-miR-200c-3p microRNA EXPRESSION IN BRAIN TUMOR**

**Aim.** Despite scientific and clinical success, glioblastoma remains the most aggressive tumor of the brain with extremely low prognostic potential for the patient. Biomarkers determining prognosis, and hence a treatment strategy, remains an actual problem at the moment. miRNAs can be considered as markers of glioblastoma. World's long-term study confirm the legitimacy of miRNAs usage as reliable markers for the tumors diagnosis and prognosis, in particular brain tumors. The purpose of our study was miRNAs targeting, the change in expression of which in gliomas can be reliably associated with malignancy degree and tumor progression. **Methods.** To achieve the purpose of the investigation there were used such methods as bioinformatics search of the miRNAs for 3'-UTR genes associated with gliomas development, RNA isolation and miRNA-specific synthesis of cDNAs. The expression levels of miRNAs were determined by the real-time quantitative PCR (qPCR). The relative expression levels of targeted miRNAs were evaluated by comparing their content in tumor and adjacent tissues, conditionally healthy brain tissues of the same patients. **Results.** The analysis of qPCR results showed a decreased concentration of miR-30a-5p and miR-200c-3p in brain tumors relative to adjacent normal tissue in average of the 5 and 5.8 times, respectively ( $p < 0.0001$ ). Area under the ROC curve analysis of miR-30a-5p was  $AUC = 0.88528$ , for miR-200c-3p -  $AUC = 0.808$ . **Conclusions.** As an additional diagnostic and prognostic marker of glioblastoma signature determination, the expression level of hsa-miR-30a-3p and hsa-miR-200c-3p showed a good diagnostic potential ( $AUC = 7-9$ ).

**Keywords:** glioblastoma, microRNA, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-200c-3p.