

## РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ССАТ1 И SNHG14 В АКТИВАЦИИ РЯДА БЕЛОК-КОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА ЯИЧНИКОВ

О.И.Бровкина<sup>1,2</sup>, И.В.Пронина<sup>1</sup>, А.М.Бурдённый<sup>1</sup>, Л.А.Урошлев<sup>1,3</sup>,  
Е.А.Филиппова<sup>1</sup>, М.В.Фридман<sup>3</sup>, Т.П.Казубская<sup>4</sup>, К.И.Жордания<sup>4</sup>,  
В.И.Логинов<sup>1</sup>, Н.Е.Кушлинский<sup>4</sup>, Э.А.Брага<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, РФ; <sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва; <sup>3</sup>Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва; <sup>4</sup>ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина Минздрава России, Москва

Поздняя диагностика рака яичников представляет одну из важнейших проблем в его лечении. Длинные некодирующие РНК (днРНК) мало изучены, но перспективны в качестве диагностических биомаркеров. Изучали интерактом днРНК для выявления биомаркеров с потенциальной значимостью для молекулярной диагностики рака яичников. С помощью скрининга базы данных TCGA выявили дифференциально экспрессируемые днРНК ССАТ1 и SNHG14. На основании показателей комплементарности ССАТ1 и SNHG14 последовательностям мРНК были выбраны 5 белок-кодирующих генов: *MAPK1*, *c-MET*, *TGFB2*, *SNAIL1*, *WNT4*, которые связаны с эпителиально-мезенхимальным переходом. Методом ПЦР в реальном времени в 54 образцах рака яичника подтверждена высокая экспрессия *ССАТ1* и *SNHG14* ( $\log_{2}FC > 1.5, p < 0.05$ ). Установлена положительная корреляция между уровнями экспрессии двух днРНК и мРНК пяти генов эпителиально-мезенхимального перехода в шести парах. Активирующее влияние ССАТ1 и SNHG14 на экспрессию этих генов может реализовываться при посредничестве miR-203 и miR-124.

**Ключевые слова:** рак яичников; длинные некодирующие РНК; микроРНК; эпителиально-мезенхимальный переход; биомаркеры

Рак яичников (РЯ) — один из наиболее агрессивных видов рака у женщин, показатели смертности от которого растут во всем мире. Плохая выживаемость при данном типе рака в значительной степени обусловлена бессимптомным протеканием заболевания и выявлением опухоли на поздних стадиях. Поэтому разработка методов раннего выявления РЯ на основе молекулярных биомаркеров представляется актуальной и своевременной.

Адрес для корреспонденции: brov.olia@gmail.com.  
Бровкина О.И.

DOI 10.47056/0365-9615-2021-172-12-764-768

Длинные некодирующие РНК (днРНК) рассматривают в качестве новых перспективных биомаркеров. днРНК — один из классов РНК длиной более 200 нуклеотидов, которые не транслируются в белок. Недавние исследования показали, что днРНК участвуют во многих онкологических процессах. днРНК играют важную роль в пролиферации, миграции и инвазии малигнизированных клеток, в частности, при РЯ [11]. С появлением микрочипов высокой плотности и технологий секвенирования нового поколения стало возможным проанализировать большой массив данных, связанных с представленностью днРНК при различных

типах злокачественных опухолей, в том числе при РЯ. Анализ открытых баз данных позволяет выявить *in silico* значимые днРНК.

Целью данной работы являлось изучение роли новых днРНК в молекулярных механизмах канцерогенеза у больных РЯ, а также определение потенциальных биомаркеров для молекулярной диагностики заболевания на основе анализа уровня днРНК. Был проведен скрининг дифференциально экспрессируемых (ДЭ) днРНК, информация по которым была представлена в специализированной базе онкологических заболеваний TCGA (The Cancer Genome Atlas Program, Атлас геномных данных по онкологическим заболеваниям; <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Cancer-Genome-Atlas>). Для днРНК, обнаруженных в результате скрининга, определены белок-кодирующие гены-мишени, связанные с развитием опухолевых процессов. В экспериментальной части работы проверена корреляция экспрессии выбранных днРНК и их таргетных мРНК.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Биоинформатический анализ.** Методы скрининга статистически значимых ДЭ-генов днРНК были описаны нами ранее [1]. Из базы данных TCGA собирали информацию о представленности транскриптов днРНК в образцах опухоли и нормальных тканей. С помощью построения предсказательных математических моделей отбирали днРНК, потенциально связывающиеся с ассоциированными с метастазами микроРНК (miR-124-3p, miR-125b, miR-129, miR-148a, miR-203a, miR-375; ( $r_s = -0.33$  -  $-0.63$ ,  $p < 0.002$ ), онкосупрессорная роль которых была доказана в наших предыдущих работах [2,6]. Затем осуществляли *in silico* поиск таргетных белок-кодирующих генов, связанных с процессами канцерогенеза. Для этого применяли программы LncRRsearch (<http://rtools.cbrc.jp/LncRRsearch/>) и LncRNADisease v2.0 (<http://www.rnanut.net/Lncrnadisease/>). Выбранные пары днРНК-мРНК были включены в дальнейший экспериментальный анализ.

**Клинические данные.** Исследование включало 54 парных образца опухолей и прилежащей гистологически неизменённой ткани яичников (табл. 1). В НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина образцы были собраны и морфологически охарактеризованы на основании критериев классификации ВОЗ [12]. Критерии включения в исследования: диагностированный врачом-онкологом РЯ, подтверждённый морфологическим

исследованием опухоли, согласно критериям ВОЗ, а также отсутствие специфического лечения (химиотерапии) до проводимого исследования. Исследование выполнено в соответствии с требованиями GCP (Good Clinical Practice) и Хельсинкской декларацией по защите прав человека.

Образцы тканей хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Полученные в ходе биопсии или хирургического вмешательства образцы объёмом до  $5\text{ мм}^3$  измельчали с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax T 10 basic (IKA).

**Выделение РНК.** Тотальную РНК выделяли с использованием гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Перед использованием все образцы РНК обрабатывали ДНКазой.

Обратную транскрипцию РНК проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV ("Евроген") с добавлением случайных гексануклеотидных праймеров. Для анализа контаминации наряду с образцами, содержащими РНК, были включены отрицательные водные контроли.

**Таблица 1.** Клиническая характеристика 54 образцов, полученных от больных РЯ

Клинико-морфологические параметры	Количество наблюдений
Возраст	
<40 лет	9
40-60 лет	26
>60 лет	19
Клиническая стадия заболевания	
I	9
II	9
III	34
IV	2
Размер первичной опухоли	
T1	7
T2	12
T3	35
Метастазы в регионарных лимфатических узлах	
Nx	8
N0	32
N1	14
Наличие метастазов*	
Есть	44
Нет	10

**Примечание.** \*Учитывали метастазы в регионарных лимфатических узлах, отдалённых органах и перитонеальные метастазы.

**Анализ экспрессии генов днРНК и мРНК.** Для ПЦР в реальном времени использовали термоциклер CFX96 (Bio-Rad). В смесь для ПЦР добавляли раствор, содержащий интеркалирующий краситель SYBR Green, qPCRMix-HS SYBR ("Евроген"). Полученный микс раскапывали в 96-луночную плашку. Общий объём ПЦР составлял 20 мкл. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95°C/20 с — 1 цикл; 95°C/1 с, 62°C/20 с — 40 циклов. Для измерения экспрессии использовали референсный ген *B2M*. Контролем служили прилежащие непоражённые ткани. Праймеры, использованные в ПЦР, представлены в таблице 2. Наличие и длину продукта проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с интеркалирующим красителем EtBr.

**Статистический анализ.** График амплификации обрабатывали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager v3.1. Применялся метод  $\Delta\Delta C_t$  с учётом референсных образцов. Данные всех экспериментов были объединены в одно исследование с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager v3.1. Коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ), а также уровень значимости для корреляции были рассчитаны с помощью программы R-Studio.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 608 случаев РЯ, представленных в базе данных TCGA, были отобраны 345, содержащие информацию о количестве нуклеотидных прочтений, выравнивающихся на транскрипт, — FPKM

(Fragments Per Kilobase Million). С помощью построения предсказательных математических моделей удалось выявить ряд ДЭ днРНК, удовлетворяющих заданным параметрам, включая *CCAT1*, *SNHG12*, *SNHG14*, *SNHG17*. Согласно данным базы LncRRIsearch, наибольшее количество спаренных оснований у *CCAT1* наблюдается с мРНК следующих генов: *c-MET*, *SNAIL1*, *WNT4*, *TGFB2*, *PALM3*, *RAD54*, *APOB*, *SLC6A*, *CDKN2A*, *ADAM9*, *CDK4*. Для *SNHG14* характерны взаимодействия с *MAPK1*, *SNAIL1*, *WNT3*, *SOX4*, *SLC25A*, *PARP11*, *YAP1*, *ZEB1*. Из полученного списка обращают на себя внимание гены *c-MET*, *MAPK1*, *SNAIL1*, *TGFB2*, *WNT4*. Продукты этих генов участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) клеток — процессе, приводящем к опухолевой прогрессии.

Результаты ПЦР в реальном времени подтвердили повышенный уровень *CCAT1* и *SNHG14* в опухолевых тканях (десятичный логарифм соотношения уровней экспрессии в опухоли и в норме  $\log_{10} FC > 1.5$ ,  $p < 0.05$ ) (рисунок). Проведённый статистический анализ подтвердил значимую положительную корреляцию между уровнями экспрессии днРНК и мРНК в четырёх парах, включающих *CCAT1*, и в двух парах, включающих *SNHG14* (табл. 3).

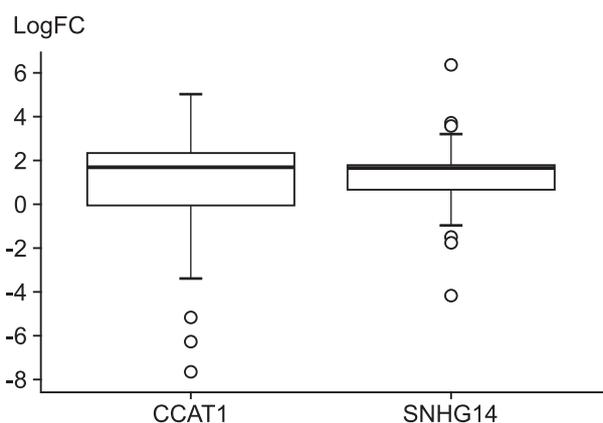
ДнРНК *CCAT1* — транскрипт 1, ассоциированный с колоректальным раком (colon cancer associated transcript 1). В международных опубликованных исследованиях продемонстрирован высокий уровень экспрессии и онкогенная роль *CCAT1* при различных типах рака [5].

**Таблица 2.** Последовательность праймеров и условия их отжига

Ген	Последовательность праймеров	Температура отжига, °C
<i>CCAT1</i>	F: CTCCAATGGTGAGGAGGTTTAG	62
	R: GGCTAGTTAGAGCCGAGATTTG	
<i>SNHG14</i>	F: CCTCCTCCCTCAACCAATATC	62
	R: GCCAGAACTACAGTGTTCAGTAA	
<i>c-MET</i>	F: AGCGTCAACAGAGGGACCT	62
	R: GCAGTGAACCTCCGACTGTATG	
<i>SNAIL1</i>	F: TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	62
	R: AGATGAGCATTGGCAGCGAG	
<i>TGFB2</i>	F: TGCAGAACCCAAAAGCCAGAGTG	60
	R: TACAAAAGTGCAGCAGGGACAGTG	
<i>B2M</i>	F: TGACTTTGTACAGCCCAAGATAG	64
	R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	
<i>WNT4</i>	F: AGGAGGAGACGTGCGAGAAA	62
	R: CGAGTCCATGACTTCCAGGT	
<i>MAPK1</i>	F: TCACACAGGGTTCCTGACAGA	61
	R: ATGCAGCCTACAGACCAATATC	

Транскрипт *CCAT1* может регулировать экспрессию гена путём образования комплекса с белком [13]. Таким образом, данная днРНК может активировать посттранскрипционную регуляцию генов, сплайсинг и трансляцию. Кроме того, *CCAT1* выступает в качестве конкурирующей эндогенной РНК (ceRNA) для микроРНК, в том числе онкосупрессорных [4]. Данная работа сфокусирована на этом способе регуляции. Последовательность *CCAT1* комплементарна miR-203, поэтому "впитывает, как губка" эту онкосупрессорную микроРНК, что, в свою очередь, может приводить к повышению экспрессии онкогенов *c-MET*, *TGFB2*, *WNT4*, *SNAIL1*. Изменение равновесия в экспрессии этих генов способствует началу ЭМП. Согласно исследованиям [10], TGF- $\beta$ , канонический сигнальный путь WNT/ $\beta$ -катенин, регулирующий дифференцировку клеток трансмембранный рецепторный белок NOTCH1, семейство белков Hedgehog, отвечающее за рост и специализацию клеток, и универсальный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла, — главные регуляторы молекулярных каскадов ЭМП. Основными факторами транскрипции, ускоряющими процесс, считаются *SNAIL1*, *SNAIL2* (семейство транскрипционных факторов, ингибирующих адгезию, Snail Family Transcriptional Repressor 1 и 2), *TWIST1*, *TWIST2* (транскрипционные факторы, регулирующие дифференцировку, миграцию, пролиферацию, выживание клеток и воспалительные реакции, Twist-related protein 1 и 2), *ZEB1* и *ZEB2* (белки, входящие в состав комплекса цинковых пальцев, регулирующих длину хромосомных теломер, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 и 2) [8]. При активной экспрессии данных генов эпителиальные клетки приобретают морфологические признаки и функциональные свойства мезенхимных клеток. ЭМП считается одним из ранних процессов, ведущих впоследствии к диссеминации опухоли [7].

ДнРНК *SNHG14* — транскрипт гена 14 малой ядрышковой РНК (small nucleolar RNA host gene 14). Исследований, посвящённых роли *SNHG14* в развитии рака, гораздо меньше, чем исследований *CCAT1*. Было показано, что *SNHG14* преимущественно экспрессируется в ядре, что указывает на его потенциальную роль в регуляции транскрипции генов. miR-124 — основная таргетная микроРНК для *SNHG14* [9]. miR-124 может подавлять пролиферацию и метастазирование клеток посредством конкурентного связывания с транскриптами генов *ERK1/2*



Уровень экспрессии *CCAT1* и *SNHG14*, выраженный в показателях logFC ( $p < 0.05$  для каждой днРНК).

**Таблица 3.** Коэффициент корреляции Спирмена и уровень его значимости для пар мРНК-днРНК

мРНК	днРНК	$r_s$	$p$
<i>c-MET</i>	CCAT1	0.44	0.01
<i>WNT4</i>		0.42	0.02
<i>TGFB2</i>		0.55	0.00
<i>SNAIL1</i>		0.63	0.00
<i>MAPK1</i>	SNHG14	0.54	0.00
<i>SNAIL1</i>		0.43	0.02

и *MAPK1*. С помощью вестерн-блоттинга показано, что нокдаун *SNHG14* снижает отношение фосфорилированного белка ERK1/2 к общему ERK1/2 в клеточной линии гепатокарциномы Huh-7, что указывает на положительную регуляцию MAPK/ERK-сигнального каскада *SNHG14* [14]. Эти результаты согласуются с полученными нами данными: при РЯ уровень экспрессии днРНК *SNHG14* имел положительную корреляцию с мРНК гена *MAPK1*.

Таким образом, с помощью биоинформатического скрининга нами выявлены днРНК, способные конкурентно связываться с онкосупрессорными микроРНК: *CCAT1* с miR-203a, *SNHG14* с miR-124-3p. Обнаруженные днРНК имели наибольшую комплементарность с пятью белок-кодирующими генами, задействованными в ЭМП: *c-MET*, *MAPK1*, *SNAIL1*, *TGFB2*, *WNT4*. Методом ПЦР в реальном времени была подтверждена повышенная экспрессия генов *CCAT1* и *SNHG14* у больных РЯ, а также выявлены положительные корреляции между уровнями экспрессии в 6 парах: *CCAT1* и *c-MET*, *WNT4*, *TGFB2*, *SNAIL1*, а также *SNHG14* с *MAPK1* и *SNAIL1*. Эти результаты впервые обнаружили 6 новых потенциальных взаимодействий между днРНК *CCAT1* и *SNHG14* и 5 генами, связанными с ЭМП.

Полученные результаты указывают на вовлечённость изменений экспрессии генов *CCAT1* и *SNHG14* в процесс ЭМП, что согласуется с данными международной масштабной работы о роли днРНК *CCAT1* в ЭМП и инициации метастазирования при РЯ [3]. Причём регуляторные функции днРНК *CCAT1* и *SNHG14* могут реализовываться при посредничестве miR-203a и miR-124 соответственно по механизму конкурентных эндогенных РНК (ceRNA). Важно также, что повышенный уровень экспрессии *CCAT1* и *SNHG14* можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров для диагностики начала метастазирования у больных РЯ.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 20-15-00368). Часть биоинформатических исследований *in silico* выполнена за счёт гранта РФФ № 21-75-00041 (<https://rscf.ru/project/21-75-00041/>).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бровкина О.И., Пронина И.В., Урошлев Л.А., Фридман М.В., Логинов В.И., Казубская Т.П., Уткин Д.О., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А. Идентификация новых дифференциально экспрессирующихся длинных некодирующих РНК с онкогенным потенциалом // Мол. биол. 2021. Т. 55, № 4. С. 598-605. doi: 10.31857/S0026898421030034
2. Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Лукина С.С., Иванова Н.А., Пронина И.В., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Изменение уровня метилирования группы генов микроРНК как фактора развития и прогрессии рака молочной железы // Патол. физиол. и экспер. тер. 2021. Т. 65, № 3. С. 4-11. doi: 10.25557/0031-2991.2021.03.4-11
3. Cao Y., Shi H., Ren F., Jia Y., Zhang R. Long non-coding RNA *CCAT1* promotes metastasis and poor prognosis in epithelial ovarian cancer // Exp. Cell Res. 2017. Vol. 359, N 1. P. 185-194. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.030
4. Deng L., Yang S.B., Xu F.F., Zhang J.H. Long noncoding RNA *CCAT1* promotes hepatocellular carcinoma progression by functioning as let-7 sponge // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2015. Vol. 34, N 1. ID 18. doi: 10.1186/s13046-015-0136-7
5. Liu Z., Chen Q., Hann S.S. The functions and oncogenic roles of *CCAT1* in human cancer // Biomed. Pharmacother. 2019. Vol. 115. ID 108943. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108943
6. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyi A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Khodyrev D.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis // Gene. 2018. Vol. 662. P. 28-36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005
7. Ribatti D., Tamma R., Annese T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: a historical overview // Transl. Oncol. 2020. Vol. 13, N 6. ID 100773. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100773
8. Stemmler M.P., Eccles R.L., Brabletz S., Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors // Nat. Cell Biol. 2019. Vol. 21, N 1. P. 102-112. doi: 10.1038/s41556-018-0196-y
9. Sun X., Shen H., Liu S., Gao J., Zhang S. Long noncoding RNA *SNHG14* promotes the aggressiveness of retinoblastoma by sponging microRNA-124 and thereby upregulating *STAT3* // Int. J. Mol. Med. 2020. Vol. 45, N 6. P. 1685-1696. doi: 10.3892/ijmm.2020.4547
10. Vasaikar S.V., Deshmukh A.P., den Hollander P., Adanki S., Kuburich N.A., Kudaravalli S., Joseph R., Chang J.T., Soundararajan R., Mani S.A. EMTome: a resource for pan-cancer analysis of epithelial-mesenchymal transition genes and signatures // Br. J. Cancer. 2021. Vol. 124, N 1. P. 259-269. doi: 10.1038/s41416-020-01178-9
11. Wang J.Y., Lu A.Q., Chen L.J. LncRNAs in ovarian cancer // Clin. Chim. Acta. 2019. Vol. 490. P. 17-27. doi: 10.1016/j.cca.2018.12.013
12. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs / Eds R.Kurman, M.L.Carcangiu, C.S.Herrington, R.H.Young. Lyon, 2014.
13. Xiang J.F., Yin Q.F., Chen T., Zhang Y., Zhang X.O., Wu Z., Zhang S., Wang H.B., Ge J., Lu X., Yang L., Chen L.L. Human colorectal cancer-specific *CCAT1-L* lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the *MYC* locus // Cell Res. 2014. Vol. 24, N 5. P. 513-531. doi: 10.1038/cr.2014.35
14. Xu X., Song F., Jiang X., Hong H., Fei Q., Jin Z., Zhu X., Dai B., Yang J., Sui C., Xu M. Long non-coding RNA *SNHG14* contributes to the development of hepatocellular carcinoma via sponging miR-217 // Onco Targets Ther. 2020. Vol. 13. P. 4865-4876. doi: 10.2147/OTT.S244530