Казахский Национальный университет им. аль-Фараби

УДК 601.4:618.19-006.55 На правах рукописи

АЙСИНА ДАНА ЕВГЕНЬЕВНА

Взаимодействие miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы

6D070100-Биотехнология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор,
член корр. РАН Имянитов Е.Н.;
доктор биологических наук, профессор
Иващенко А.Т.

Республика Казахстан
Алматы, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 4
ВВЕДЕНИЕ 5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 9
1.1. Рак молочной железы 9
1.1.1 Роль генов в развитии рака молочной железы 11
1.1.2 Субтипы рака молочной железы 14
1.2 Маркеры и методы диагностики рака молочной железы 15
1.3 Роль транскрипционных факторов в развитии рака молочной железы 17
1.3.1 Роль транскрипционных факторов семейства E2F в развитии РМЖ 18
1.4 Биогенез miRNA 19
1.4.1 miRNA в развитии рака молочной железы 21
1.5 Гены, участвующие в развитии рака молочной железы субтипа HER2 22
1.6 Гены, участвующие в развитии рака молочной железы субтипов luminal A и B 23
1.7 Гены, участвующие в развитии рака молочной железы субтипа triple-negative 24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 28
3.1 Создание базы данных по miRNA человека 28
3.2 Создание баз данных по генам, связанным с раком молочной железы 31
3.3 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов семейства E2F, связанных с развитием РМЖ 34
3.4 Характеристики сайтов связывания miR-1322 с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы 44
3.5 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа HER2 50
3.5.1 Характеристики сайтов связывания miRNA из miRBase с mRNA кандидатных генов субтипа HER2 50
3.5.2 Характеристики сайтов связывания miRNA (Londin et al.) с mRNA кандидатных генов субтипа HER2 53
3.6 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B 58
3.6.1 Характеристики сайтов связывания miRNA из miRBase с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B 58
3.6.2 Характеристики сайтов связывания miRNA (Londin et al.) с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B 60
3.7 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative 64
3.7.1 Характеристики сайтов связывания miRNA из miRBase с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative 64
3.7.2 Характеристики сайтов связывания miRNA (Londin et al.) с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative 69
3.8 Предсказание кластеров сайтов связывания miRNA с mRNA 73

кандидатных генов
3.9 Взаимодействия miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* генов 92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 99
ВЫВОДЫ 100
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 102

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Ago2 - Argonaute 2 protein - белок комплекса RISC
CDS - белок-кодирующая область mRNA
E2F - семейство транскрипционных факторов E2F1 - E2F8
GenBank - база данных по нуклеотидным последовательностям белок-кодирующих генов и РНК
HER2 субтип - HER2 положительный субтип
luminal A и B субтипы - Люминальный А и Б субтипы
miRNA - mRNA-inhibiting RNA - миРНК (мРНК-ингибирующая РНК)
miRBase – база данных по предшественникам и зрелым miRNA
mRNA - матричная РНК (мРНК)
NCBI - National Center for Biotechnology Information - национальный центр биотехнологической информации
pre-miRNA - предшественник miRNA
pri-miRNA - предшественник pre-miRNA
PUBMED - Biochemical Literature Citation and Abstracts – база данных по абстрактам и цитированию биохимической литературы
RISC - RNA-induced silencing complex - РНК-индуцируемый комплекс выключения генов
triple-negative субтип - трижды-отрицательный или базальноподобный субтип
XPO5- exportin 5
База данных - БД
ОЗ - онкологическое заболевание
НРМЖ - наследственный рак молочной железы
нт - нуклеотид
РМЖ - рак молочной железы
5'UTR - 5'-нетранслируемая область mRNA
3'UTR - 3'-нетранслируемая область mRNA
RPKM - reads per kilobase per million of mapped reads - число прочтений на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений
TNM - Tumor - первичная опухоль, Node - метастазы в региональные лимфатические узлы, Metastases - отдалённые метастазы.

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы.

Работа посвящена изучению взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы, и поиску диагностических маркеров на основе ассоциаций miRNA и генов для ранней диагностики этого заболевания.

Актуальность темы исследования.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает одно из первых мест среди всех онкозаболеваний в мире. Данные статистики последних лет демонстрируют интенсивный, неуклонный рост заболеваемости и смертности от рака молочной железы в Казахстане и других странах [1-2].

В связи с тем, что более 50% больных раком молочной железы впервые обращаются в медицинские учреждения уже на поздних стадиях заболевания, в структуре смертности населения Казахстана онкологические заболевания продолжают занимать 2 место после сердечно-сосудистых заболеваний [3]. Поэтому актуальность разработки новых и совершенствование существующих методов диагностики не вызывает никаких сомнений.

Рак молочной железы является многофакторным заболеваниеми и его возникновение зависит от изменения экспрессии, мутаций множества генов. Например, до 25% наследственных случаев заболеваемости РМЖ связаны с мутацией в одном из некоторых идентифицированных, высоко-пенентрантных генов (*BRCA1, BRCA2*, *PTEN*, *TP53, CDH1* и *STK11*), которые приводят к 80% риска заболеваемости РМЖ. Дополнительные 2% - 3% случаев обусловлены мутацией в умеренно-пенентрантных генах (например, *CHEK2*, *BRIP1*, *ATM* и *PALB2*), каждый из которых связан с двукратным увеличением риска заболеваемости раком молочной железы [4]. Различные субтипы рака молочной железы отличаются набором кандидатных генов, участвующих в развитии этого заболевания. Установление взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы, является одним из наиболее перспективных методов исследований. miRNA представляют собой небольшие молекулы РНК, влияющие на экспрессию и трансляцию мРНК (mRNA) и легко обнаруживаются в крови. Некоторые из них могут быть потенциальными биомаркерами рака молочной железы [5].

В настоящее время в мире не существует полной базы генов и miRNA, связанных с раком молочной железы. Поэтому необходимо выявление ассоциаций miRNA с генами, указывающих на рак молочной железы и его субтипы, которые могут быть биомаркерами для диагностики субтипов РМЖ и играть ключевую роль в его возникновении и развитии. Под ассоциацией понимается связь конкретной(ых) miRNA с конкретным(ыми) геном. Результаты исследования взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы, могут послужить в качестве основы для дальнейших разработок молекулярно-генетических маркеров,

которые будут нужны для выявления групп повышенного риска развития рака молочной железы у населения Республики Казахстан.

Цель работы: изучить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы.

Задачи исследования:

1. Создать базы данных по miRNA и генам, участвующим в развитии рака молочной железы.
2. Установить характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов семейства *E2F* и участие miR-1322 в развитии рака молочной железы.
3. Определить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа HER2 рака молочной железы.
4. Определить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипов luminal A и B рака молочной железы.
5. Определить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа triple-negative рака молочной железы.
6. Установить особенности взаимодействия пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA их генов-мишеней.
7. Установить ассоциации miRNA и mRNA генов для разработки методов диагностики рака молочной железы.

Объекты исследования: нуклеотидные последовательности miRNA и mRNA генов человека, участвующих в развитии рака молочной железы.

Предмет исследования: характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии РМЖ.

Научная новизна исследования.

Научная новизна и оригинальность исследования заключается в установлении характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов, связанных с развитием рака молочной железы. Сайты взаимодействия miRNA с mRNA были выявлены в 5’UTR, CDS и 3’UTR mRNA генов-мишеней.

Впервые выявлено, что из 602 кандидатных генов рака молочной железы, только mRNA *E2F3* гена содержит множественные сайты для 22 miRNA в CDS. Было выявлено, что взаимосвязи сайтов связывания этих miRNA с mRNA сложились давно и на протяжении миллионов лет дивергенции изученных объектов эти взаимосвязи практически не изменились.

Впервые установлена кластерная организация сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов РМЖ.

Впервые определены характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative (basal-like) рака молочной железы.

Впервые выявлены ассоциации miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы, которые предложены в качестве диагностических маркеров.

Теоретическая значимость работы заключается в создании базы данных по miRNA и генам, участвующим в развитии рака молочной железы.

Установлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов рака молочной железы. Выявлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа HER2 рака молочной железы. Выявлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипов luminal A и B рака молочной железы. Выявлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии субтипа triple-negative рака молочной железы. Установлена структурная организация сайтов связывания miRNA в mRNA генов рака молочной железы. Установлены ассоциации miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы. Эти результаты существенно расширяют представление о функционировании miRNA.

Практическая ценность исследования заключается в разработке основ метода ранней диагностики субтипов рака молочной железы с использованием ассоциаций miRNA и генов-мишеней. Полученные результаты используются при чтении дисциплины «Бионанотехнологии в диагностике и терапии».

Основные положения, выносимые на защиту:

Из 602 кандидатных генов рака молочной железы 325 кандидатных генов, включающих специфичные гены субтипов заболевания, являются мишенями miRNA и их экспрессия может регулироваться этими miRNA.

Сайты связывания miRNA находятся в 5’UTR, CDS и 3’UTR mRNA кандидатных генов рака молочной железы. Распределение сайтов связывания miRNA в 5’UTR, CDS или 3’UTR специфично для каждого из генов.

Большинство кандидатных генов являются мишенью одной или нескольких miRNA сайты связывания, которых расположены в mRNA отдельно друг от друга. В mRNA других кандидатных генов сайты связывания miRNA расположены с наложением нуклеотидных последовательностей, образуя кластеры сайтов связывания двух и более miRNA.

Для субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative имеются специфические ассоциации miRNA и mRNA кандидатных генов разных субтипов.

Несколько пар miRNA-5p и miRNA-3p, происходящих из одной pre-miRNA, взаимодействуют с mRNA их генов-мишеней полностью комплементарно.

Связь с планом основных научных работ.

Диссертационная работа выполнена в рамках проекта «Разработки тест-систем ранней диагностики сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний на основе ассоциаций miRNA и их генов мишеней» № AP05132460 МОН РК.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены:

- на международных научных конференциях студентов и молодых учёных «Фараби алеми», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, 2017г. и 2018 г.;

- на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биотехнологии, экологии и физико-химической биологии», Алматы, 6-7 апреля 2017 г.;

- на IX международном конгрессе «Biotechnology: state and development prospects», Москва, Россия, 20-22 февраля, 2017 г.;

- в II всероссийской конференции с международным участием «High-throughput sequencing in genomics», Новосибирск, Россия, 18-23 июня, 2017 г.;

- на международной научно-практической конференции «The science of new time: from idea to result», Санкт-Петербург, Россия, 18-19 августа 2017 г.;

- на международной конференции «Clinical proteomics. Postgenomic medicine» Москва, Россия, 30 октября-1 ноября 2017 г.;

- на международном форуме «Biotechnology: state and development prospects», Москва, Россия, 23-25 мая, 2018 г.;

- на 11 Международной конференции BGRS/SB-2018 «Integrative Bioinformatics and Systems Biology», WIBSB-2018, Новосибирск, Россия, 22-23 августа 2018 г.;

- на Московской международной конференции «Molecular phylogenetics and biobanking biodiversity » (Molphy-5), Москва, Россия, 28 августа, 2018 г.;

- на международной конференции «Biological markers in fundamental and clinical medicine», Прага, Чехия, 31 октября-02 ноября, 2018 г.;

-на международном конгрессе “Biotechnology: state of the art and perspectives”, Москва, Россия, 25-27 февраля, 2019 г.;

- на международной конференции «9-ая Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии MCCMB'19», Москва, Россия, 27-30 июля 2019 г.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 25 печатных работах, в том числе 1 статье в международном журнале с импакт-фактором, цитируемом в Web of Science; девять статей в республиканских научных журналах из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки; 15 тезисов в материалах международных конференций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список использованных источников из 290 наименований; содержит 60 таблиц и два рисунка.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) является распространенным онкологическим заболеванием во всем мире, в том числе в Центральной Азии [6-7]. В Казахстане обнаруживается рост показателя заболеваемости, пики заболеваемости и смертности отмечались у лиц в возрасте 60-74 лет и 75-84 [8-10]. Высокие показатели смертности особенно заметны у женщин с диагнозом поздней стадии РМЖ [11]. Выявлено, что у 20% - 50% пациентов с впервые диагностированным РМЖ, заболевание было уже на поздней стадии [11, с. 4797-4802]. Поздняя диагностика РМЖ негативно влияет на выживаемость больных раком. Таким образом, в развивающихся странах позднее обращение, слабая оснащенность оборудованием, неадекватные программы скрининга РМЖ приводят к выявлению рака на поздней стадии [12-13]. Связанные с пациентом факторы, такие как практика самоконтроля, кореллируют с меньшим количеством задержек начало лечения, в то время как восприятие низкого риска заболевания РМЖ приводит позднему лечению [13, с. 761-767]. Другие психологические и поведенческие факторы развития поздних стадий заболевания связаны как с задержками, связанными с больными, так и с системой здравоохранения, связанными с лечением РМЖ в странах южной Африки [12, с.2173-2182].

Существует много различных способов классификации рака молочной железы. Одним из них является, разработанная в 1943-1952 гг., система TNM для классификации злокачественных новообразований [14]. С момента своего появления система TNM стала международным средством описания анатомической степени рака и определения стадии рака, также может служить для того, чтобы помочь клиницисту в планировании лечения, может помочь с прогнозированием и оценкой результатов лечения. Для описания анатомической оценки болезни система TNM основана на оценке трех компонентов:

T - распространение первичной опухоли

N - степень поражения и наличие или отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах

M - отсутствие или наличие отдаленных метастазов [15].

Добавление чисел к этим трем компонентам указывает на степень злокачественного заболевания: T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, N3, M0, M1 [16]. Практика деления рака на группы в соответствии с так называемыми стадиями возникла из-за того, что показатели выживаемости были выше для случаев, когда заболевание было локализовано, чем для тех, в которых болезнь распространилась за пределы органа происхождения. Эти группы часто упоминались как раннее заболевание и позднее заболевание, что подразумевало некоторую регулярную прогрессию со временем. На самом деле, стадия заболевания на момент постановки диагноза может быть отражением не только скорости роста и расширения новообразования, но также типа опухоли и отношения опухоли и хозяина.

В гистологическом плане среди злокачественных опухолей молочной железы выделяются следующие типы (рисунок 1) [17]:

- Протоковый рак *in situ*
- Дольковый рак *in situ*
- Инвазивный протоковый рак
- Инвазивный дольковый рак
- Рак молочной железы с признаками воспаления
- Медуллярный рак
- Коллоидный рак
- Папиллярный рак
- Метапластический рак

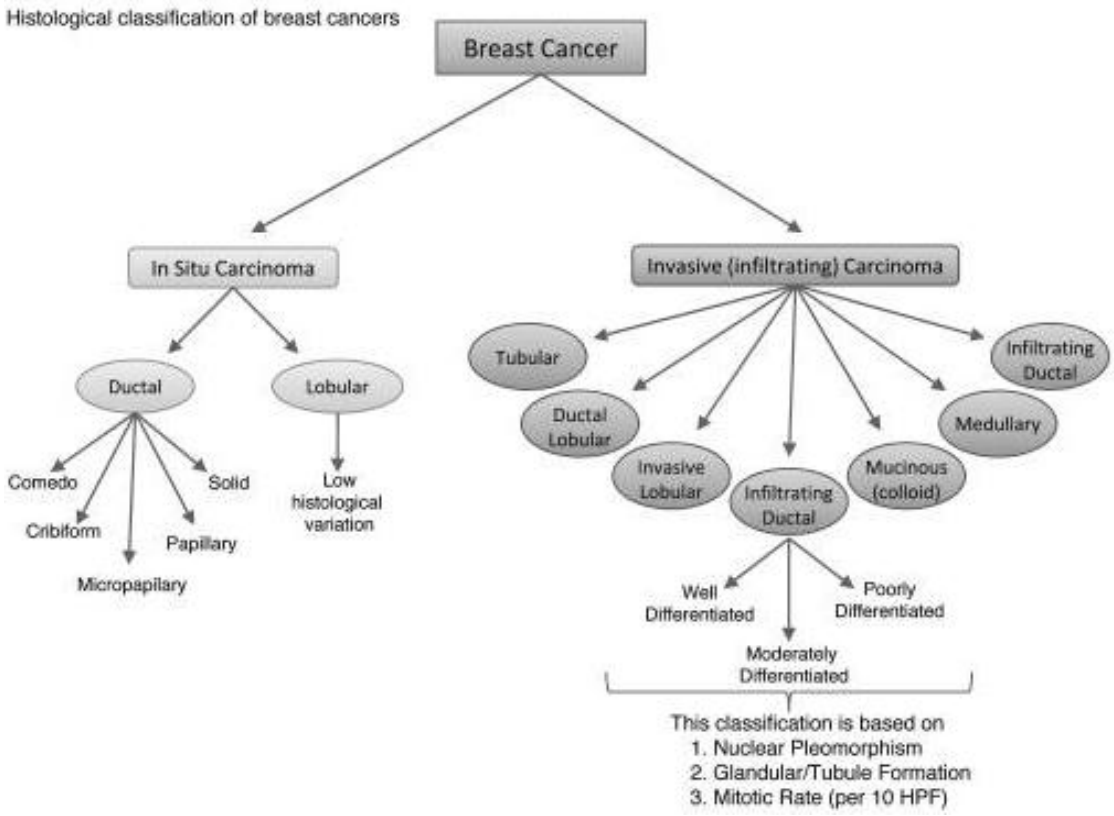


Рисунок 1 - Гистологическая классификация РМЖ [17, с. 955-960].

Чаще всего (65-80%) встречается инвазивный протоковый рак, который демонстрирует наибольшую морфологическую гетерогенность. Известны, как минимум, 5 типов морфологических структур, демонстрирующие пространственное многообразие опухолевых клеток. К ним относятся альвеолярные, тубулярные, трабекулярные, солидные структуры и дискретные группы опухолевых клеток [18].

Рак молочной железы является мультифакторным заболеванием. Среди множества факторов, которые могут влиять на экспрессию генов, наиболее вероятными причинами являются мутации с высокой степенью пенентрантности, унаследованные или приобретенные. Однако, процент случаев заболеваемости раком молочной железы, этиологически связанных с

этим типом мутаций, не превышает 10% [19-20]. Высокая вероятность развития рака от этих мутаций объясняется тем, что пораженные гены кодируют белки, участвующие в клеточных процессах, таких как: ДНК репарация, регуляция клеточного цикла и защита от свободных радикалов, являющихся важными функциями для поддержания стабильности и целостности генома [20, с. 703-718]. Существуют системы репарации, ответственные за исправление повреждений или ошибок [21]. Однако в раковых клетках стресс, вызванный внешними факторами, может увеличить частоту мутаций, поэтому системы репарации не справляются с их высоким уровнем [22]. Химические факторы, ионизирующие излучения и даже плохо сбалансированное питание в настоящее время считаются факторами риска, которые могут способствовать развитию рака [23]. Было замечено, что плохо сбалансированное питание, а именно чрезмерное потребление жирных продуктов увеличивает как гиперплазию, так и гипертрофию жировой ткани. Эта ткань является основным производителем эстрогенов у женщин в постменопаузе, так что их неконтролируемый рост приводит к большему увеличению выработки эстрогенов, чем обычно. Влияние этих гормонов на процессы клеточной пролиферации увеличивает вероятность того, что эти клетки, несущие мутации с высокой пенетрантностью, разрастаются в молочной железе [24].

Большую роль в возникновении рака молочной железы играет фактор наследственности. Наследственный рак молочной железы (НРМЖ) имеет аутосомно-доминантный тип наследования, может возникать в раннем возрасте, может передаваться как от материнской линии, так и отцовской, отличается выраженной генотипической и фенотипической гетерогенностью. НРМЖ в 70% случаев ассоциирован с мутациями в генах *BRCA1, BRCA2* [25]. В то время как менее 15% женщин с раком молочной железы имеют членов семьи с этим заболеванием, женщины, у которых есть близкие родственники с раком молочной железы, имеют высокий риск заболеваемости [26-38]. Например, наличие близкого родственника (мать, сестра или дочь) с раком молочной железы почти удваивает риск женщины, в то время как наличие двух близких родственников с этим заболеванием увеличивает риск женщины примерно в 3 раза. Интересно, что женщины с отцом или братом, у которых в семейном анамнезе есть рак молочной железы, также имеют более высокий риск этого заболевания. В контексте одного индивидуума женщина с раком в одной молочной железе имеет более высокий риск развития нового рака в другой молочной железе или в другой части той же молочной железы [39].

1.1.1 Роль генов в развитии рака молочной железы

Знание о генах вовлеченные в развитие рака важны для разработки более эффективных подходов к снижению заболеваемости и смертности от заболевания. Роль генов заключается в регуляции полноценного роста клеток молочной железы, с целью предупредить возможное появление онкологического заболевания. Если имеется аномалия или мутация в этих

генах, риск появления рака груди значительно увеличивается. Аномалии *BRCA1* и *BRCA2* генов, провоцируют десять процентов всех онкологических заболеваний молочной железы. Причины всех разновидностей онкологий молочной железы – именно изменения, присутствующие на генном уровне. За последнее десятилетие комплексные усилия по секвенированию выявили геномные формы рака человека. Для большинства типов рака этот геном состоит из небольшого количества генов, мутирующих с большим процентом появления опухолей и гораздо большего числа стабильных генов. На сегодняшний день в этих исследованиях было обнаружено примерно 140 генов, которые при изменении внутригенных мутаций могут способствовать или «стимулировать» онкогенез [40]. Гены *BRCA1* и *BRCA2* кодируют аминокислотные последовательности ядерных белков, которые участвуют в регуляции восстановления ДНК и деления клеток. В интактном (не мутантном) состоянии оба гена выступают в качестве супрессоров опухоли и обеспечивают целостность генома. Кроме того, белковые продукты генов репрессируют транскрипционную функцию гена рецептора эстрогенов, сдерживая, таким образом, избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстрогензависимых органов, в частности при половом созревании и беременности. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* приводят к повышению уровня хромосомной нестабильности в клетках, что может способствовать их опухолевой трансформации. На сегодняшний день известно более 1000 различных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, связанных с повышением риска развития рака молочной железы, яичников, предстательной железы, кишечника, гортани, кожи и др. Для реализации онкогенного эффекта достаточно, чтобы мутация присутствовала хотя бы в одном аллеле. При обнаружении мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у женщины риск развития рака молочной железы и/или яичников составляет высокий процент. Идентификация мутаций *BRCA1/2* позволяет проводить профилактические меры, которые включают скрининг на магнитно-резонансную томографию или операции по снижению риска, что улучшает выживаемость [41-42].

В последнее время различные гены, такие как ген *ATM* (ген атаксии-телеангиэктазии), *CHEK2* (checkpoint kinase 2), *TP53* (опухолевый белок p53), *CDH1* (cadherin 1), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *RAD51C* (RAD51 паралог C), *PALB2* (partner and localizer of BRCA2) и *BRIP1* (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1) привлекают внимание как восприимчивые гены рака молочной железы.

Ген атаксии-телеангиэктазии (*ATM*) ответственен за повышенную чувствительность к ионизирующей радиации и, следовательно, за повышенный риск индуцированных ею злокачественных новообразований. Действие гена проявляется даже в гетерозиготном состоянии, а доля гетерозигот среди населения в целом составляет 1-2%. При наличии данного гена даже такая процедура, как регулярная маммография, по-видимому, увеличивают риск рака молочной железы. Ген *ATM* дефектен при редком аутосомно-рециссивном заболевании атаксии телеангиэктазии (АТ), которое

сопровождается гиперчувствительностью к ионизирующему излучению, иммунной недостаточностью, риском злокачественных заболеваний, мозжечковой атаксией вследствие дегенерации нейронов и других факторов [43].

Ген *CHEK2* кодирует синтез белка-фермента чекпойнт-киназы 2. Белок данного гена *CHEK2* контролирует процессы репарации ДНК и клеточного деления, тем самым участвуя в поддержании стабильности генома. Фермент активируется в ответ на повреждение молекулы ДНК, блокируя клеточный цикл в фазе G1 или запуская процесс апоптоза, выступая в качестве супрессора злокачественной трансформации клеток. Мутации гена *CHEK2* приводят к синтезу неполноценного укороченного белка и ассоциированы с возникновением наследственных форм рака молочной железы [44].

Белок p53 (кодируемый геном TP53) является ключевым участником в ответах на стресс, которые сохраняют геномную стабильность, реагируя на множество факторов, таких как повреждение ДНК, гипоксию, метаболический стресс и активацию онкогена [45]. Кроме того, p53 взаимодействует с многочисленными клеточными белками, включая те, которые контролируют запрограммированную гибель клеток. Этот ген супрессора опухолей часто встречается в мутантном виде в различных твердых опухолях, включая опухоль молочной железы. Эти мутации приводят к отсутствию или дисфункции соответствующего белка.

Проведение генетического тестирования других генов повышенной восприимчивости к раку молочной железы, таких как *TP53, PTEN* и *CDH1*, также является важной профилактической мерой. В настоящее время, секвенирование нового поколения позволило одновременное тестирование мутаций в генах с высокой пенетрантностью и в генах с более умеренным риском. Мультигенные панели теперь коммерчески доступны и все чаще используются при оценке риска рака. У генов с высокой пенетрантностью наследственные мутации приводят к риску развития рака молочной железы в пять раз выше, чем мутации в генах с умеренной пенетрантностью, которые связаны с двукратным увеличением риска. Риски развития рака, связанные с мутациями в генах с меньшей предрасположенностью, все еще изучаются. Например, мутации в *PALB2*, которые первоначально считались причиной умеренного риска рака молочной железы, теперь, похоже, связаны с пятикратным или большим увеличением возникновения РМЖ [46]. Кроме того, мутации в генах репарации ДНК, такие как *BRIP1, RAD51C* и *PALB2*, связаны с повышенным риском развития рака молочной железы.

Было показано, что *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* играют важную роль в развитии рака молочной железы [47, 48]. Уровень экспрессии генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* в молочной железе варьирует от 0,1 до 5,5 RPKM. Forkhead box F2 (*FOXF2*) функционирует как фактор транскрипции и играет решающую роль в программировании органогенеза, регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и пролиферации клеток. Данные недавних исследований продемонстрировали участие *FOXF2* в раке молочной железы [49]. Известно,

что снижение экспрессии mRNA *FOXF2* связано с ранним началом метастазирования и плохим прогнозом при раке молочной железы [50].

1.1.2 Субтипы рака молочной железы

Благодаря развитию молекулярно генетических технологий установления причин онкологических заболеваний (ОЗ) в последние годы выявлены десятки и сотни генов участвующих в развитии конкретных типов и субтипов ОЗ [51]. На основе иммуногистохимического исследования экспрессии клетками карциномы молочной железы рецепторов к эстрогену и прогестерону (ER и PR), а также рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (Her2/neu, ErbB2) в настоящее время в молекулярной классификации РМЖ выделяется четыре основных молекулярных субтипа [52-55]. Они различаются благодаря тому, какие цитокератины в них экспрессируются (люминальные или базальные), а также присутствует или отсутствует амплификация гена *HER2*, так же основываются на профилях экспрессии генов в соответствии со следующими маркерами: рецептор эстрогена (ER), рецептор прогестерона (PR), рецептор андрогенов (AR), белки антиапоптоза (Bcl-2, p53), белки пролиферации клеток, матриксные металлопротеиназы (MMP), интегрины, белки передачи трансдукции, циклины, циклин зависимые киназы (CDK), эпителиально-мезенхимальные факторы, кадгерины, транскрипционные факторы, факторы контроля метастаз, факторы, определяющие кровеносные сосуды [56-59]. Эти субтипы представляют собой разные болезни с разной этиологией, молекулярным патогенезом и прогнозом, различаясь между собой характерными наборами маркеров.

На основе иммуногистохимических маркеров рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER-2), рак молочной железы подразделяется на четыре основных субтипа, включая luminal A (ER+ и / или PR+ , HER-2-), luminal B (ER+ и / или PR+, HER-2+), HER2 (ER-, PR-, HER-2+) и triple-negative (basal-like) (ER-, PR-, HER-2-) [60-61]. К люминальным относятся опухоли, экспрессирующие рецепторы к ER и PR, и в зависимости от экспрессии Her2/neu их классифицируют на A (не экспрессируют Her2/neu) и B (экспрессируют Her2/neu). HER2+ называются опухоли с гиперэкспрессией Her2/neu и отсутствием ER и PR. Опухоли, негативные по трем выше названным признакам, относятся к triple-negative (базальноподобному) РМЖ. Кроме того, разные субтипы рака молочной железы имеют разные факторы риска и клиническое проявление. Например, для субтипа triple-negative рака молочной железы характерна повышенной агрессивность, более плохой прогноз по сравнению с другими субтипами [61, с.806-814].

Установлено, что люминальные типы связаны с менее агрессивным течением и хорошим прогнозом по сравнению с HER2 и triple-negative [55, с. 10393-10398; 62]. Triple-negative субтип связан с высокой частотой мутации *BRCA1*, агрессивным течением, отсутствием реакции на гормонотерапию и препараты для лечения РМЖ, низкой общей и безрецидивной

выживаемостью [55 с. 10393-10398; 62, с. 2492-2502; 63-64].

На основе клинических данных эти субтипы отличаются по частоте встречаемости, скорости роста, инвазивности, способности к метастазам и т.д. Причиной таких отличий субтипов РМЖ являются разные наборы генов, участвующих в проявлении этих субтипов онкогенеза [65].

1.2 Маркеры и методы диагностики рака молочной железы

В последние десятилетия произошел рост разработок методов диагностики рака молочной железы. Достижения в области генетического тестирования позволили сделать многие методы, например, секвенирование более быстрым и менее дорогостоящим, чем это можно было себе представить всего несколько лет назад. Так, с помощью секвенаторов нового поколения можно проводить одновременный анализ большого количества генов, участвующих в развитии рака молочной железы [66]. Для оценки риска рака эта новая технология проявилась в виде тест панелей со множеством генов, которые позволяют анализировать от шести до более 100 генов. Хотя подходы на основе анализа целого генома применяются для диагностики онкологических заболеваний, на сегодняшний день они менее эффективны, чем генные панели меньшего размера, ориентированные на диагностику рака [67].

Первоначально были созданы относительно ограниченные тесты для диагностики рака молочной железы, состоящие из шести генов, участвующих в РМЖ *BRCA1/2, CDH1, PTEN, STK11, TP53*. Впоследствии панели увеличились, до более чем 100 генов, которые обладают потенциальными ассоциациями с раком молочной железы, например, *ATM, AXIN2, BARD1, CDKN2A, CHEK2, CYLD, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PALB2, SLX4* и другие гены) [68].

В качестве диагностики рака молочной железы для женщин с повышенным риском данного заболевания используется метод МРТ анализа как дополнение к скрининговой маммографии. Исследования показали, что МРТ-скрининг улучшает диагностику рака, в дополнение к маммографии, обнаруживая большую долю раковых образований на этапах 0-I среди женщин с высоким риском [69-76].

Семейный анамнез рака молочной железы является решающим фактором в персонализировании методов ее диагностики. В настоящее время предпринимаются усилия по разработке генетического таргетного скрининга молочной железы. Для женщин с семейным анамнезом рака молочной железы, но без обнаружения мутаций с помощью генетического тестирования, семейный анамнез является ключевым фактором для использования таких методов диагностики, как МРТ и маммография груди [77].

Известны клинико-патологические маркеры диагностики РМЖ. К ним можно отнести лимфатические и сосудистые инвазии, степень дифференциации опухолевых клеток, размеры первичной опухоли (категория

T), и наличие метастазов в регионарных подмышечных лимфатических узлах (категория N), наличие микрометастазов в костном мозге [78].

Одним из чувствительных прогностических клинико-морфологических маркеров является обнаружение опухолевых клеток в костном мозге на начальном этапе диагностики заболевания. У 30% больных операбельным ранним клиническим раком молочной железы можно обнаружить опухолевые клетки в костном мозге. Маркером более высокого риска рецидива и смерти и независимым прогностическим фактором худшей выживаемости являются скрытые раковые клетки в аспирате костного мозга. В нынешнее время клинико-морфологические маркеры и факторы риска развития РМЖ пытаются заменить анализом генной сигнатуры, которую изучают с помощью разнообразных панелей микрочипов [79].

Молекулярные маркеры используюся для улучшения эффективности терапии и оценки прогноза заболевания. По данным Национального института здравоохранения США (NIH) и Консорциума биомаркеров, молекулярным маркером является индикатор патогенных или нормальных биологических процессов или фармакологический ответ на терапевтическое вмешательство [80]. Хотя большинство из этих маркеров являются белками, в последнее время модели экспрессии генов, измененная ДНК и miRNA также занимают важное место в качестве опухолевых маркеров [81-83].

До настоящего времени были обнаружены различные биомаркеры генов для диагностики рака молочной железы. Например, *Erβ* может уменьшить онкогенез путем снижения регуляции цикла опухолевых клеток и транскрипции в T-47D [84]. Кроме того, хемокиновый рецептор *CXCR7* может способствовать пролиферации клеток рака молочной железы, взаимодействуя с *EGFR* [85].

Другим примером молекулярных маркеров является ген *GATA3* – транскрипционный фактор, играющий важную роль в пролиферативной активности клеток рака молочной железы luminal A и B субтипов и дифференцировке, по сути, являясь опухолевым супрессором. По некоторым данным, позитивная экспрессия *GATA3* может наблюдаться при инвазивной карциноме неспецифического типа, включая базальные опухоли, а также метапластический РМЖ [86, 87]. Кроме того, известно, что ген *GATA3* может быть использован как диагностический маркер, показывающий высокую специфичность при метастазах рака молочной железы [88].

Также известно, что высокая экспрессия *GATA3* ассоциирована с ER-положительными опухолями низкой степени злокачественности и сочетается с благоприятным прогнозом [89, 90]. Mehra с сотрудниками выявили, что низкий уровень экспрессии *GATA3* наблюдался при опухолях с высокой степенью злокачественности, с наличием метастазов в лимфатических узлах, больших размеров, а также с отрицательным гормональным статусом. У таких пациенток наблюдалась низкая безрецидивная выживаемость по сравнению с больными, у которых опухоль имела высокий уровень экспрессии *GATA3* [91].

1.3 Роль транскрипционных факторов в развитии рака молочной железы

В человеческих клетках существует более 1000 различных ДНК-связывающих факторов транскрипции, которые могут модулировать экспрессию генов, воздействуя на активность РНК-полимеразы II [92]. Большинство факторов транскрипции имеют две различные структурные области, которые необходимы для их регуляторной функции: специфичный для последовательности ДНК-связывающий домен (например, цинковый палец) и домен активации транскрипции/репрессии, который взаимодействует с различными кофакторами (коактиваторами, корепрессорами). Известно, что факторы транскрипции являются одними из важнейших факторов онкологических заболеваний человека [93]. В большинстве случаев развитие рака молочной железы характеризуется изменением в регуляции факторов транскрипции [94, 95]. При развитии раковых заболеваний в генах, кодирующих транскрипционные факторы, часто происходят делеции, перестройки посредством хромосомных транслокаций или точечные мутации, которые приводят к увеличению, либо к потере его функций [96]. Также известно, что мутация кофакторов транскрипционных факторов является дополнительным механизмом канцерогенеза [97]. Кроме того, многие онкогенные сигнальные пути приводят к изменению функции транскрипционных факторов как средства реализации изменений экспрессии генов, которые в конечном итоге приводят к возникновению раковых клеток [96, с. 740-749].

Было подсчитано, что факторы транскрипции составляют 20% всех онкогенов при развитии онкологии [92, с. 252-263]. Классическим примером является онкосупрессор p53, изменение функций, которого происходит в более чем в половине всех случаев рака человека [98]. Белок TP53 лучше всего характеризуется, как ДНК связывающий транскрипционный фактор, способный связываться с несколькими сотнями различных промоторных элементов в геноме, следовательно, регулируя экспрессию сотен генов. Была выявлена фундаментальная роль TP53 в регулировании ключевых клеточных процессов, связанных с контролем над пролиферацией и сохранением целостности и стабильности генома [99]. Белок TP53 активируется в ответ на различные сигналы стресса, такие как повреждение ДНК, гиперпролиферативные сигналы, гипоксия, окислительный стресс, подавляя клеточную трансформацию и пролиферацию, главным образом, путем остановки клеточного цикла, восстановления ДНК и апоптоза. За эти годы была выявлена роль TP53 в других клеточных процессах, таких как обмен веществ, ангиогенез, иммунные реакции, поддержание стволовых клеток [100]. Ключевая роль белка TP53 в патогенезе рака человека и высокая распространенность мутаций TP53 во всех раковых опухолях человека неоспорима. При раке молочной железы в настоящее время имеются убедительные доказательства того, что мутационный статус TP53 связан с худшим прогнозом и безрецидивной выживаемостью [101]. В этом

исследовании мутации в TP53 были связаны с повышенной смертностью у пациентов с luminal B, HER2, но не у пациентов с triple-negative опухолями.

Другим важным примером воздействия транскрипционных факторов на опухолегенез является семейство транскрипционных факторов E26 (ETS), которые влияют на статус рецепторов фактора роста (GFR), таких как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), и способствуя метастазированию [102]; c-Myb, фактор транскрипции, который часто требуется для трансформации миелоидных клеток-предшественников в клетках лейкемии [103]; семейство транскрипционных факторов активаторного белка 1 (AP-1), которые участвуют в различных злокачественных новообразованиях человека и активно участвуют в прогрессировании и развитии опухолей [104]; активатор транскрипции c-Myc, необходимый белок во многих клеточных процессах, начиная от пролиферации и до апоптоза. Изменение экспрессии c-Myc происходит во многих раковых опухолях человека, в то время как прекращение функции c-Myc приводит к регрессии опухоли [105].

1.3.1 Роль транскрипционных факторов семейства E2F в развитии РМЖ

Семейство E2F представляют собой группу транскрипционных факторов, включая ≥ 10 участников, кодируемых восемью различными генами [106]. Исследователи разделили E2F на две подгруппы: транскрипционные активаторы (*E2F1-E2F3*) и репрессоры (*E2F4-E2F8*) на основе их структур и функций [106, с.2403-2414; 107]. Семейство E2F характеризуется как центральный регулятор клеточного цикла [108]. Во время фазы G0 и ранней фазы G1 нефосфорилированный pRB связывается с некоторыми представителями семейства E2F и отрицательно регулирует их транскрипционную активность [109]. После этого циклин-зависимые киназные комплексы, опосредующие фосфорилирование белка ретинобластомы в поздней фазе G1, позволяют E2Fs активировать гены-мишени, что приводит к синтезу ДНК и белка, которые необходимы для входа в S-фазу [109, с. 157-169]. Более того, все большее число исследований выявило не только простое участие семейства E2F в регуляции клеточного цикла [110, 111], было также установлено, что многие физиологические процессы, такие как пролиферация, апоптоз, ДНК репарация, старение и аутофагия, которые, как известно, имеют решающее значение в онкогенезе, в значительной степени зависят от участия семейства E2F [110, с. 2389-2397; 111, с. 7882-7893].

При злокачественных новообразованиях человека семейство E2F часто разрегулированы. Известно, что повышение экспрессии *E2F1* чаще происходит при развитии рака легкого по сравнению с нормальными тканями, а высокий уровень *E2F1* дает менее положительный результат лечения [112, 113]. При карциноме клеток печени замечена сверхэкспрессия *E2F1, E2F3, E2F4* и *E2F8* в образцах опухолей [114-116]. Сверхэкспрессия *E2F8* способствует пролиферации клеток карциномы печени путем продвижения клеток во вступление в S-фазу, которая может быть

опосредована транскрипционным эффектом *E2F8* на циклин D1 [115, с. 782-791]. Предыдущие исследования показали, что экспрессия нескольких членов семейства E2F была повышена при раке яичников, а высокие уровни экспрессии *E2F4* и *E2F7* были связаны с улучшением прогноза заболевания, тогда как *E2F8* показал снижение общей выживаемости [117-119]. Недавние исследования продемонстрировали, что семейство E2F может выступать в качестве перспективных биомаркеров рака молочной железы [120-122]. Исследование, основанное на 165 карциномах молочной железы с поражением лимфатических узлов, показало, что у пациентов с *E2F1*-положительными опухолями наблюдается увеличение рецидивов и общая выживаемость меньше, чем у пациентов с *E2F1*-негативными опухолями [120, с. 11-16]. Увеличение экспрессии *E2F4* показало снижение выживаемости у пациентов с раком молочной железы [121, с. 754-761]. Фудзивара с коллегами [122, с. 1924-1932] определили, что экспрессия *E2F2* связана с частотой безрецидивной выживаемости. Хотя эти данные свидетельствуют о том, что E2F могут служить надежными маркерами рака молочной железы, тем не менее, различные уровни экспрессии, различные механизмы взаимодействия mRNA данных генов с miRNA и прогностическое значение большинства членов семейства E2F остаются до конца не изученными. Поэтому требуется всестороннее исследование всех восьми генов E2F.

1.4 Биогенез miRNA

миРНК (miRNA) представляют собой малые некодирующие РНК длиной 22-25 нуклеотидов, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции путем таргетного присоединения к mRNA мишеням [123].

Последовательности miRNA могут кодироваться генами, лежащими в интронах, экзонах, а также могут происходить из межгенных участков всего генома [124]. Биогенез miRNA начинается в клеточном ядре с их транскрипции РНК-полимеразой II [125], а некоторые другие miRNA транскрибируются с помощью РНК-полимеразы III [125, с. 4051-4060; 126], что приводит к образованию первичного транскрипта, известного как pri-miRNA, которая содержит шпильку, концевую петлю и фланкирующую одноцепочечную последовательность из сотен оснований. Таким образом, образуется первичная miRNA, длина которой составляет несколько сотен нуклеотидов. Зачастую, pri-miRNA «кэпированы» на 5'-конце и полиаденилированы на 3'-конце, подобно транскриптам, кодирующим белки [125, с. 4051-4060; 127]. На следующем этапе, фермент рибонуклеаза III Drosha приводит к образованию pre-miRNA путем расщепления pri-miRNA. Длина pre-miRNA составляет примерно 70 нуклеотидов, а структура представляет «шпильку». После образования pre-miRNA Exportin-5, Ran-GTP-зависимый dsRNA-связывающий белок, переносит pre-miRNA в цитоплазму [128]. Exportin-5 также может защитить pre-miRNA от ядерной деградации [129]. В цитоплазме pre-miRNA связывается с рибонуклеазой III Dicer, которая вырезает петлю шпильки, в результате формируется зрелая

двухцепочечная miRNA длиной 19-23 нуклеотида [130, 131]. Dicer является важным белком созревания miRNA, и его пониженная регуляция приводит к уменьшению количества зрелых miRNA. Фактически, при определенных условиях отсутствие Dicer является смертельным [132, 133]. Известно, что при созревании двухцепочечной miRNA, каждая из двух цепей может выступать как функциональная miRNA, однако лишь одна из цепей - «направляющая» - затем входит в рибонуклеиновый комплекс, известный как «РНК-индуцируемый комплекс выключения» гена или RISC комплекс в который входит белок Argonaute 2 (Ago2) [134-137]. У млекопитающих выбор направляющей нити продиктован термодинамической стабильностью, более устойчивая цепь в 5'-конце имеет большую вероятность включения в RISC; оставшаяся цепь (пассажирская цепь) исключается и обычно деградирует [138, 139]. Однако, существуют данные, что большое количество пассажирских цепей не деградирует и экспрессируется в сходных концентрациях с их соответствующими направляющими цепями [140]. Эти наблюдения показывают, что пассажирская цепь также может быть включена в комплекс RISC. Следовательно, одна последовательность miRNA может продуцировать две разных зрелых miRNA, каждая из которых имеет разные мишени и, следовательно, различные биологические функции [141].

Зрелая одноцепочечная miRNA, находясь в составе RISC комплекса, устойчива к действию внешних факторов, в особенности к действию эндонуклеаз, это происходит благодаря тому, что ее концы связаны с доменами главного каталитического белка комплекса - Argonaute (Ago). При этом сама miRNA, находясь в составе RISC комплекса, доступна для комплементарного взаимодействия с mRNA [142]. Считается, что мишенью для связывания miRNA является 3’-нетранслируемая область mRNA, с которой комплементарно взаимодействует небольшой участок на 5’-конце miRNA со второго по восьмой нуклеотид [136, с. 509-524]. Однако, мишенью для связывания miRNA может быть не только 3’-нетранслируемая область mRNA, также сайты связывания miRNA могут присутствовать как в последовательностях, кодирующих белки, так и в 5’-нетранслируемых областях mRNA [143, 144]. miRNA животных и человека в основном только частично комплементарна своей мишени, вследствие чего одна miRNA может иметь сразу много мишеней, и наоборот - одна miRNA может взаимодействовать со многими miRNA [145, 146].

Механизм регуляции экспрессии генов, опосредованной miRNA, включает репрессию трансляции mRNA с последующей ее деградацией [142, с. 29-38]. Механизм репрессии трансляции остается во многом неясным. Предполагается, что miRNA может сначала блокировать трансляцию, снижая скорость ее инициации, а затем запускает 5’-3’-экзонуклеазную деградацию mRNA [142, с. 29-38; 147, 148]. Таким образом, miRNA в составе с комплексом RISC функционирует для распознавания мишеней mRNA на основе правил комплементарности для дальнейшего отрицательного регулирования mRNA. Во время этого процесса Ago2, белок с активностью расщепления РНК, вместе с GW182, который взаимодействует с

цитоплазматическим поли (А)-связывающим белком (PABP) и PAN2-PAN3, играет центральную роль в miRNA-опосредованном mRNA-замалчивании [149, 150].

1.4.1 miRNA в развитии рака молочной железы

К числу молекул, участвующих в регуляции экспрессии большинства генов генома человека, относятся miRNA, которые эффективно влияют на экспрессию белок-кодирующих генов-мишеней [151-156]. Регуляторная сеть специфических генов и miRNA многогранна, поскольку множество miRNA могут регулировать один и тот же ген, в то время как одна miRNA может нацеливаться на множество генов [157]. Учитывая регуляторные способности miRNA в таких процессах, как пролиферация клеток, адгезия и миграция, дисрегуляция miRNA, она играет значительную роль в развитии рака, включая рак молочной железы [158-160].

Роль miRNA в раке молочной железы представляет собой перспективный подход для лучшего понимания развития рака молочной железы, хеморезистентности и метастазов. Многие исследования показали, что miRNA играют ключевую роль не только в возникновении, но и в прогрессировании злокачественных новообразований, включая рак молочной железы [161]. Энерли и его команда идентифицировали miRNA, экспрессирующиеся при раке молочной железы, связанные с молекулярными характеристиками опухоли (такими как мутации TP53 и статус рецептора эстрогена (ER) [162].

Известно, что miRNA связаны с хеморезистентностью рака молочной железы, существующие данные показывают, что многие miRNA, такие как miR-20a и miR-27b могут участвовать в хеморезистентности рака молочной железы [163-165].

В течение более десяти лет различные исследования указывали на актуальность изучения miRNA при раке, указывая на то, что они могут выступать в качестве онкогенов, либо в качестве опухолевых супрессоров, негативно воздействующих на белок-кодирующие онкогены, либо как oncomiR, подавляющие известные опухолевые супрессоры [166, 167].

Функциональные исследования продемонстрировали, что miRNA могут влиять на фенотип рака, и в нескольких публикациях были установлены профили экспрессии miRNA, которые предоставляют информацию о происхождении опухоли, прогнозе или предсказания риска возникноваения заболевания [168, 169]. Одной из наиболее важных проблем в исследовании рака молочной железы является обнаружение стабильных биомаркеров, которые можно легко измерить в доступных образцах. В этом отношении, может быть использован профиль экспрессии miRNA в качестве точного инструмента для диагностики и прогнозирования рака, поскольку их экспрессию можно легко измерить в образцах биопсии, фиксированных формалином, либо помещенных в парафин тканях, а также в жидкостях организма, таких как плазма и сыворотка крови [170]. Был продемонстрирован потенциал ряда miRNA как из внеклеточных (таких как

плазма), так и внутриклеточных (тканевых) источников для диагностики и прогнозирования рака [171]. Идентификация взаимосвязи между циркулирующими miRNA и тканевыми miRNA, поддерживает предположение, что циркулирующие miRNA подходят в качестве биомаркера для различных видов рака [170, с. 1912-1938]. В последние годы при раке молочной железы изучалась роль в заболевании многих miRNA. Например, исследования показали, что экспрессия miR-9 в некоторых раковых опухолях, включая рак молочной железы, противоречива, неясно, miR-9 действует как онкоген или как опухолевый супрессор [172-174]. Например, miR-106b и miR-26a функционируют при раке молочной железы человека как онкогены и как онкосупрессоры, соответственно [175-178].

1.5 Гены, участвующие в развитии рака молочной железы субтипа HER2

Одними из генов, принимающих участие при развитии рака молочной железы субтипа Her, являются гены *ADAM10* и *ADAM17*. Было показано, что два наиболее изученных адамализина, *ADAM10* и *ADAM17*, способствуют приобретению лекарственной устойчивости HER2-положительного рака молочной железы в ответ на трастузумаб (препарат при лечении РМЖ) [179-181]. Таким образом, показано, что нативные и приобретенные клеточные линии, устойчивые к трастузумабу, чувствительны к ингибированию *ADAM10* посредством предотвращения высвобождения лиганда и ингибирования активации рецептора HER. Эффект ингибирования *ADAM10* аналогичен эффекту, наблюдаемому при ингибировании тирозинкиназной активности рецепторов HER нератинибом [182]. Другим возможным эффектом ингибирования *ADAM10* является противодействие передаче сигналов Notch, которые участвуют в устойчивости к трастузумабу [183]. Различные исследования оценивали клиническую значимость *ADAM*. *ADAM9* был повышен при раке молочной железы по сравнению с нормальной тканью молочной железы и положительно коррелировал с экспрессией HER2 [184]. Экспрессия *ADAM17* была повышена при раке молочной железы по сравнению с нормальной тканью молочной железы и была самой высокой при метастазировании лимфатических узлов [185]. Было показано, что экспрессия *ADAM10* не коррелирует с какими-либо известными прогностическими маркерами. Однако лечение трастузумабом приводит к повышению уровня *ADAM10* у пациентов с HER2-положительным раком молочной железы, а более высокая базальная экспрессия *ADAM10* связана с более слабым ответом на лечение трастузумабом и безрецидивной выживаемостью [186].

Другим геном, принимающим участие в развитии рака молочной железы субтипа HER2, является *BRCA2* [187]. Известно, что риск развития рака молочной железы наиболее высок у женщин с появлением мутации *BRCA1* гена или *BRCA2*: в проспективном исследовании у носителей *BRCA1* может развиться рак молочной железы в возрасте 80 лет с вероятность 72%, у *BRCA2* носителей, с вероятностью 69% [188].

CDK6 также является участником рака молочной железы субтипа HER2. Циклин-D-циклинзависимые киназы (*CDK*) представляют собой протеин-серин/треонин-киназы, принадлежащие к семейству CMGC (Циклин-зависимые протеинкиназы, Митоген-активируемые протеинкиназы, Гликоген синтазные киназы и CDK-подобные киназы) [189]. Ингибиторы CDK4/6 контролируют переход между фазами G1 и S клеточного цикла и предотвращают пролиферацию раковых клеток. Селективные ингибиторы CDK4/6 «выключают» киназы и дефосфорилируют белок ретинобластомы (Rb), приводят к блокированию прогрессирования клеточного цикла в середине G1 фазы [190]. Ингибиторы CDK4/6 изменяют варианты лечения эстрогенного рецептора (ER), негативного прогрессирующего или метастатического рака молочной железы, положительного по рецептору HER2.

Другим геном участником рака молочной железы субтипа HER2 является ген *NISCH* (нискарин). Первой функцией, приписываемой нискарину, была его роль в качестве белка, связывающего интегрин a5b1 [191]. Таким образом, белок нискарин способен влиять на движение и миграцию клеток, способствуя подавлению роста и развития опухоли молочной железы [192]. Структурные и функциональные домены нискарин способствуют его взаимодействию с 17 известными белками, чтобы влиять на клеточную адгезию, миграцию клеток, перенос везикул, апоптоз, метаболизм глюкозы и передачу сигналов клетками. До настоящего времени заболевания, связанные с геном *NISCH*, включают рак молочной железы, гипертонию, ксеростомию, морфиновую зависимость, депрессию, беспокойство, гипертрофию желудочков, сердечную недостаточность, розацеа и другие. Его расположение в хромосоме 3p21.1 помещает его в категорию генов-супрессоров опухолей, которые связаны с развитием многих видов рака, в том числе рака молочной железы [193]. Высокоагрессивные клетки рака молочной железы часто демонстрируют геномную потерю локуса *NISCH*, тогда как промотор *NISCH* гиперметилируется при раках легких [194]. Экспрессия mRNA и белка нискарин высока в образцах молочной железы человека стадии 0, но снижена в образцах рака молочной железы стадии I-IV [193, с. 1513-1528].

1.6 Гены, участвующие в развитии рака молочной железы субтипов luminal A и B

Одним из участников развития рака молочной железы субтипов luminal A и B является ген *ANGPTL4.* Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) является секретируемым белком, который расщепляется на два активных пептида [195]. Домен N-конца является мощным ингибитором активности липопротеинлипазы и модулирует липидный состав и энергетический гомеостаз [195, с. 15747-15756]. Домен C-конца участвует в заживлении ран, проницаемости сосудов и ангиогенезе [196]. *ANGPTL4* играет роль в содействии прогрессирования нескольких типов рака, в том числе и рака молочной железы [197, 198] и коррелирует с плохим ответом на терапию

анти-VEGF [199].

Другим геном участником рака молочной железы субтипов luminal A и B является ген *FOXA1*. Данный ген входит в семейство FOXA и представляет собой класс ДНК-связывающих белков [200]. До настоящего времени было показано, что семейство FOXA вовлечено во многие типы рака [201]. Блокирование активности *FOXA1* может замедлять рост опухоли при множественных раковых заболеваниях, включая, как одного из факторов, при раке молочной железы [202] и немелкоклеточном раке легких [203].

HMGA2 также является одними из генов участников рака молочной железы субтипа luminal A и B. *HMGA2* выступает в качестве фактора транскрипции, вносящего структурные изменения в хроматин [204]. Белки HMGA2 находятся в большом количестве во время эмбриогенеза и онкогенеза, тогда как их экспрессия заметно снижается в терминально дифференцированных клетках [205]. *HMGA2* влияет на различные биологические процессы, включая репарацию ДНК [206-208], пролиферацию клеток [209, 210], старение [211], эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) [212-214] и восстановление теломер [215]. Экспрессия *HMGA2* может быть обнаружена при различных раковых заболеваниях, в том числе рака молочной железы, и коррелирует со степенью злокачественности и метастатическим потенциалом [216-220]. Кроме того, экспрессия гена *HMGA2* повышена в различных раковых клетках, которые могут сенсибилизировать раковые клетки к лизису или защищать раковые клетки от различных генотоксических агентов [221].

Другим геном участником рака молочной железы субтипа luminal A и B является *SOX4*. Повышенная экспрессия транскрипционного фактора *SOX4* наблюдается при большом количестве раковых заболеваний человека, что указывает на общую роль в онкогенезе [222, 223]. В соответствии с этим представлением было обнаружено, что у гипоморфных мышей *Sox4* значительно снижает частоту возникновения спонтанных опухолей [224]. Наоборот, повышенная экспрессия *SOX4*, как было продемонстрировано, способствует прогрессированию опухоли как в гематопоэтических, так и в твердых опухолях [225-227]. Недавно стало очевидно, что *SOX4* является ключевой транскрипционной мишенью сигнального пути трансформирующего фактора роста (TGF-) в различных типах клеток, включая Т-клетки, клетки гипофиза, эпителиальные клетки молочной железы и клетки глиомы [228-231].

1.7 Гены, участвующие в развитии рака молочной железы субтипа triple-negative

Мутации в гене *BRCA1* могут быть связаны с triple-negative субтипом: 60-80% опухолей молочной железы, которые возникают у носителей мутаций *BRCA1*, имеют этот фенотип [232]. Мутации гена *BRCA1* встречаются примерно у 29% пациентов с раком молочной железы субтипа triple-negative еврейского происхождения Ашкенази [233], у 20% пациентов с triple-negative, диагностированных в раннем возрасте или с семейным анамнезом

рака молочной железы [234], и у 8-20% пациентов с приобретенным раком молочной железы субтипа triple-negative [235-240]. Другим геном участником рака молочной железы субтипа triple-negative является ген *CEACAM5*. Ген, кодирующий карциноэмбриональный антиген *CEACAM5*, сверхэкспрессируется при раке желудочно-кишечного тракта, раке молочной железы и т.д. Он играет важную роль в метастазировании опухоли и может быть связан с прогнозом рака молочной железы [241]. Помимо своей функции молекулы клеточной адгезии, *CEACAM5* играет важную роль в других клеточных процессах, включая ингибирование программ дифференцировки [242], ингибирование апоптоза в клетках [243], нарушение поляризации клеток [242, с. 151-163]. *CEACAM5* регулирует эти процессы путем активации сигнальных путей интегрина и включает интегрин связанную киназу, PI3K и AKT [244]. Одним из генов участников рака молочной железы субтипа triple-negative является ген *IL11*. *IL11* является членом гликопротеина 130 семейства цитокинов, которое также включает IL-6 и IL-27 [245]. Эта группа цитокинов имеет общую рецепторную субъединицу GP130 и способна активировать преобразователь сигнала Janus kinase (*JAK*) и активатор пути транскрипции 3 (*STAT3*) [246, 247].

Ген *MAPT* является участником развития рака молочной железы субтипа triple-negative. Ассоциированный с микротрубочками белок Tau (MAPT) был впервые описан при болезни Альцгеймера [248]. MAPT способствует сборке тубулина и стабилизации микротрубочек путем связывания с поверхностями микротрубочек [249]. Сообщалось, что MAPT может специфически уничтожать пролиферирующие раковые клетки, основываясь на его способности регулировать митоз [250]. Было показано, что дисрегуляция метилирования промотора *MAPT* связана с химиорезистентностью рака [251]. Кроме того, несколько клинических исследований показали, что экспрессия *MAPT* очень важна при опухолевом развитии рака молочной железы [252-254]. Еще одним геном, участвующим при раке молочной железы субтипа triple-negative, является ген *STMN1*. Stathmin1 (STMN1), также известный как онкопротеин 18 (Op18), является повсеместно экспрессируемым, высоко консервативным, цитозольным фосфопротеином с молекулярной массой 18 кДа, который активируется при некоторых злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы [255]. Повышенная экспрессия белка STMN1 и посттрансляционная модификация заметно усиливают пролиферацию и инвазивность раковых клеток [256, 257], что позволяет предположить, что STMN1 играет важную роль в прогрессировании рака. STMN1 фосфорилируется по четырем консервативным сериновым остаткам (Ser16, Ser25, Ser38 и Ser63), а фосфорилирование по Ser16 или Ser63 сильно снижает или устраняет способность STMN1 связываться и связывать растворимый тубулин [258]. Фосфорилирование по Ser38 является предполагаемым биомаркером для прогрессирования опухоли и плохого прогноза [259].

Приведеный выше обзор данных литературы свидетельствует о недосточной изученности многих проблем онкогенеза, в том числе участие

miRNA в этом процессе. Несмотря на многие исследования, которые уже были проведены, изучение взаимодействий miRNA с mRNA генов, участвующих при РМЖ изучено слабо, поэтому диссертация посвященна данной теме. Изучение только изменений концентрации miRNA при развитии рака молочной железы не дает адекватной оценки какие miRNA могут участвовать в этом процессе, поскольку не оценивалось прямое влияние их на экспрессию кандидатных генов. Поэтому необходимо предсказание наиболее вероятных ассоциаций miRNA и кандидатных генов. Существующие программы предсказания сайтов связывания miRNA с mRNA имеют ряд недостатков. Они не дают количественых характеристик связывания miRNA с mRNA, а они необходимы для оценки конкуренции между miRNA. Следовательно, использование программы может существенно повысить эффективность предсказания количественных характеристик взаимодействия miRNA с mRNA. Многолетний опыт использования только miRNA для диагностики заболеваний показывает, что такой подход неудовлетворителен и необходимо учитывать экспрессию их генов мишеней. Поэтому нужно изучить все miRNA человека как на кандидатные гены, так и на другие гены человека, чтобы учитывать побочные эффекты miRNA. Требуется изучение структурной организации сайтов связывания miRNA в mRNA, что важно при конкуренции между miRNA при взаимодействии с mRNA. Выявленные выше проблемы участия miRNA в онкогенезе диктуют необходимость их решения и обосновывают актульность поставленной цели диссертационной работы.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве материалов для проведения исследований были использованы нуклеотидные последовательности mRNA генов человека и животных (таблица 1), взятые из баз данных GeneBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), COSMIC (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic). Нуклеотидные последовательности 2564 miRNA были взяты из базы miRBase (www.mirbase.org/). Последовательности 3707 miRNA, отсутствующих в базе miRBase, были заимствованы из публикации Londin и сотрудников [260]. Значения RPKM (Reads Per Kilobase Million) для генов взяты из Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org). Диаграммы Logo были получены при помощи сайта https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi. Публикации о роли различных генов в развитии рака молочной железы человека, собраны на основе баз данных PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Поиск генов мишеней для miRNA проводили по программе MirTarget [261]. Программа определяет начало сайтов связывания miRNA с mRNA, расположение сайтов в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), в белок-кодирующей части (CDS) и в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) mRNA, свободную энергию гибридизации (ΔG, кДж/моль) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Для каждого сайта рассчитывали отношение ΔG/ΔGm (%), где ΔG - свободная

энергия взаимодействия, а ΔGm равно свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отбирали с величиной ΔG/ΔGm равной более 85%, для повышения достоверности полученных результатов. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида 5'UTR mRNA.

Таблица 1 - Список названий видов животных и их кратких названий

Латинское название видов животных	Краткие названия	Латинское название видов животных	Краткие названия
Acinonyx jubatus	*Aju*	*Macaca fascicularis*	*Mfa*
Ailuropoda melanoleuca	*Ame*	*Macaca mulatta*	*Mml*
Alteromonas naphthalenivorans	*Ana*	*Macaca nemestrina*	*Mne*
Alligator mississippiensis	*Ami*	*Maylandia zebra*	*Mze*
Alligator sinensis	*Asi*	*Monodelphis domestica*	*Mdo*
Anolis carolinensis	*Aca*	*Mus musculus*	*Mmu*
Balaenoptera acutorostrata	*Bac*	*Myotis brandtii*	*Mbr*
Bos mutus	*Bmu*	*Myotis davidii*	*Mda*
Bos taurus	*Bta*	*Nannospalax galili*	*Nga*
Callithrix jacchus	*Cja*	*Nomascus leucogenys*	*Nle*
Camelus ferus	*Cfe*	*Oryctolagus cuniculus*	*Ocu*
Canis familiaris	*Cfa*	*Ovis aries*	*Oar*
Capra hircus	*Chi*	*Pan paniscus*	*Ppa*
Cavia porcellus	*Cpo*	*Pan troglodytes*	*Ptr*
Chlorocebus sabaeus	*Csa*	*Panthera tigris altaica*	*Pti*
Coturnix japonica	*Cja*	*Papio anubis*	*Pan*
Cricetulus griseus	*Cgr*	*Pantholops hodgsonii*	*Pho*
Cynoglossus semilaevis	*Cse*	*Pongo abelii*	*Pab*
Danio rerio	*Dre*	*Pongo pygmaeus*	*Ppy*
Equus asinus	*Eas*	*Pteropus alecto*	*Pal*
Equus caballus	*Eca*	*Rattus norvegicus*	*Rno*
Equus przewalskii	*Epr*	*Rhinopithecus bieti*	*Rbi*
Felis catus	*Fca*	*Rhinopithecus roxellana*	*Rro*
Gallus gallus	*Gga*	*Saimiri boliviensis*	*Sbo*
Gorilla gorilla	*Ggo*	*Sus scrofa*	*Ssc*
Heterocephalus glaber	*Hgl*	*Tupaia chinensis*	*Tch*
Hipposideros armiger	*Har*	*Ursus maritimus*	*Uma*
Homo sapiens	*Hsa*	*Xenopus laevis*	*Xla*
Loxodonta africana	*Laf*	*Xenopus tropicalis*	*Xtr*
Lipotes vexillifer	*Lve*		

Программа MirTarget учитывает взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA генов-мишеней не только между аденином (A) и урацилом (U), гуанином (G) и цитозином (C), но и между A и C, G и U, посредством одной водородной связи. Расстояния между A и C равны значениям между G и C, A и U, G и U [262, 263]. Число водородных связей во взаимодействиях G-C, A-U, G-U и A-C составляет 3, 2, 1 и 1, соответственно. Все используемые в настоящее время программы поиска сайтов связывания miRNA в mRNA не

учитывают взаимодействие канонических пар, что снижает их предсказательные возможности. Преимуществом программы MirTarget является выявление miRNA связывающихся с mRNA не только в 3'UTR, но и по всей длине в 5'UTR, CDS и 3'UTR в соответствии с физико-химическими свойствами этих молекул. При отборе ключевых ассоциаций miRNA с mRNA генов, участвующих при раке молочной железы, были отобраны сайты связывания miRNA с учётом следующих критериев: для miRNA с длиной 17 нт были отобраны сайты связывания со значением $\Delta G/\Delta G_m$ от 98% и выше, 18 нт - от 96%, 19 нт - от 94%, 20 нт - от 92%, 21 нт - от 91%, 22 нт - от 90%, 23 нт - от 89%, 24 нт - от 88%, 25 нт - от 87% и 26 нуклеотидов - от 86% и выше. При таких критериях miRNA имеют примерно равное количество нуклеотидов, связывающихся комплементарно в mRNA гена-мишени. Эти критерии отбора сайтов связывания позволяют в сравнительном аспекте оценивать влияние miRNA с различной длиной. Вычисления проводились на суперкомпьютере КазНУ им. Аль-Фараби.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Создание базы данных по miRNA человека

Была создана база данных (БД) по нуклеотидным последовательностям 6266 miRNA человека, часть которых представлена в таблице 2. Была создана БД нуклеотидных последовательностей ортологичных miRNA, демонстрирующая, что в течение десятков и сотен миллионов лет эволюции животных вся нуклеотидная последовательность подавляющего числа miRNA у разных видов остается неизменной, за исключением 1-2 фланкирующих нуклеотидов у членов семейства miRNA, часть из которых представлена в таблице 3 [264]. Известно, что нуклеотидная последовательность сайтов связывания некоторых miRNA в mRNA остается консервативной в процессе эволюции [265, 266].

Таблица 2 - miRNA, заимствованные из публикации Londin *et al*. [260, с. 1106-1115], с введенными нами краткими обозначениями.

Краткие обозначения miRNA	Обозначения miRNA по Londin *et al., 2015*	Нуклеотидные последовательности miRNA
1	2	3
miR-1-356-5p	TJU_CMC_MD2.ID00112.5p-miR	cgagcccggccaaaaauguuu
miR-1-155-3p	TJU_CMC_MD2.ID00061.3p-miR	ggcggggcggcggcggcggugg
miR-1-265-3p	TJU_CMC_MD2.ID00089.3p-miR	cggcggcggcgggaggggcgc
miR-1-1510-5p	TJU_CMC_MD2.ID00252.5p-miR	cggggcggcgcggcgggagguggc
miR-1-1714-3p	TJU_CMC_MD2.ID00071.3p-miR	cggcggcggcggagcgcggg
miR-1-1819-3p	TJU_CMC_MD2.ID00278.3p-miR	ccucccugccgccgccgcuccac
miR-1-1904-5p	TJU_CMC_MD2.ID00297.5p-miR	aguggggcgggagcagaccaggugc
miR-1-2121-3p	TJU_CMC_MD2.ID00296.3p-miR	gcggcggcggcggggguggg
miR-1-2558-3p	TJU_CMC_MD2.ID00101.3p-miR	ccuucuucucccccacccccagc

Продолжение таблицы 2

1	2	3
miR-1-2802-3p	TJU_CMC_MD2.ID00149.3p-miR	cccccuucucccccuccuccagu
miR-2-3313-3p	TJU_CMC_MD2.ID01804.3p-miR	cggcggcggcggcggcggccccg
miR-2-4804-5p	TJU_CMC_MD2.ID01838.5p-miR	ugagcaacacagugagacuccuuu
miR-2-5674-3p	TJU_CMC_MD2.ID01839.3p-miR	ccgcggccgccccugcuccugcu
miR-2-6081-3p	TJU_CMC_MD2.ID01970.3p-miR	ccuucucuacccaucccaccaca
miR-2-6809-5p	TJU_CMC_MD2.ID01819.5p-miR	gcgcgagggcagcaaccgcacca
miR-2-6862-5p	TJU_CMC_MD2.ID01859.5p-miR	ccucuccgccaccuccaccgcg
miR-2-7331-5p	TJU_CMC_MD2.ID01911.5p-miR	cccgccccuucccccucccccug
miR-3-8100-5p	TJU_CMC_MD2.ID02294.5p-miR	cggcggcagcggcagcggagccgc
miR-3-8242-5p	TJU_CMC_MD2.ID02292.5p-miR	ugcgucugucccucgccggagcc
miR-3-9301-5p	TJU_CMC_MD2.ID02296.5p-miR	gcggcggcggcggggugugc
miR-3-9439-3p	TJU_CMC_MD2.ID02430.3p-miR	cgcccgcucuccucucccucggc
miR-4-6496-3p	TJU_CMC_MD2.ID02499.3p-miR	gggucguggcggcggcggcgg
miR-4-9774-3p	TJU_CMC_MD2.ID02457.3p-miR	ucgggcggcggcggccggcggg
miR-4-11923-3p	TJU_CMC_MD2.ID02538.3p-miR	ucggagggcggcagcggcggcg
miR-4-12861-5p	TJU_CMC_MD2.ID02460.5p-miR	ggaccugggucugggcgggguc
miR-4-13015-5p	TJU_CMC_MD2.ID02513.5p-miR	aaacacacacacacaugccauu
miR-5-3563-5p	TJU_CMC_MD2.ID02769.5p-miR	ggcggcgggcggcgggcggguc
miR-5-8853-5p	TJU_CMC_MD2.ID02770.5p-miR	gggcggucgggcggcggcgg
miR-5-15733-3p	TJU_CMC_MD2.ID02761.3p-miR	cuuggcgcggccgccgccgccgcc
miR-5-16727-5p	TJU_CMC_MD2.ID02595.5p-miR	cggcggcggcgcgccgcgug
miR-5-17008-3p	TJU_CMC_MD2.ID02623.3p-miR	gggagagcggggccaccggcgcg
miR-5-18072-3p	TJU_CMC_MD2.ID02744.3p-miR	uauagguaugagccacugaguu
miR-6-16980-5p	TJU_CMC_MD2.ID02822.5p-miR	ggacgggguagggcggggcgcgc
miR-6-17487-3p	TJU_CMC_MD2.ID02868.3p-miR	cgcacacacacacacagacaccu
miR-6-17605-3p	TJU_CMC_MD2.ID02882.3p-miR	accgcgcacacgcacacucac
miR-6-17815-3p	TJU_CMC_MD2.ID02930.3p-miR	ccgucgccagcgcgccgcccgcgc
miR-7-12728-5p	TJU_CMC_MD2.ID02979.5p-miR	agggggcuggggggcgcaggucg
miR-7-13347-5p	TJU_CMC_MD2.ID03011.5p-miR	gcaagaaagugagacucugccu
miR-7-16350-5p	TJU_CMC_MD2.ID02986.5p-miR	cgcagcgcggccgcagcagc
miR-7-20203-3p	TJU_CMC_MD2.ID03037.3p-miR	cagccccugggccgccgccucc
miR-7-21133-5p	TJU_CMC_MD2.ID03006.5p-miR	augugagccccugugcccagccca
miR-8-21978-5p	TJU_CMC_MD2.ID03119.5p-miR	ccgccccucugccccuucgccccu
miR-8-24549-5p	TJU_CMC_MD2.ID03208.5p-miR	gggccagccgggggagguggguag
miR-9-13610-3p	TJU_CMC_MD2.ID03306.3p-miR	agggcgcgcggggcggggcgg
miR-9-20317-3p	TJU_CMC_MD2.ID03332.3p-miR	ggcgccgccgccuccgccuccgcc
miR-9-23803-5p	TJU_CMC_MD2.ID03396.5p-miR	uacgucugcgccugcgccugcgcc
miR-9-24743-3p	TJU_CMC_MD2.ID03368.3p-miR	cccccauguccaacccacgcugc
miR-9-24961-3p	TJU_CMC_MD2.ID03264.3p-miR	cauaaaccacaauuacuuuugc
miR-9-26506-3p	TJU_CMC_MD2.ID03238.3p-miR	uccucuucucuccccccuccuc
miR-9-27797-5p	TJU_CMC_MD2.ID03345.5p-miR	cuccucgccccuucccccgccacc
miR-9-28523-5p	TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR	cgguggcggcggcggcgcgc
miR-10-13655-3p	TJU_CMC_MD2.ID00457.3p-miR	agggcggcggcggcggcggcuc
miR-10-26815-5p	TJU_CMC_MD2.ID00425.5p-miR	aggaggaggaggagggacucggcg
miR-10-29282-3p	TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR	uacacacauauauacgcacacac
miR-11-18690-5p	TJU_CMC_MD2.ID00564.5p-miR	cuggggggaggaggaagaggaga
miR-11-29998-3p	TJU_CMC_MD2.ID00620.3p-miR	cccgcgggccgccugcugccucc

Продолжение таблицы 2

1	2	3
miR-12-31413-3p	TJU_CMC_MD2.ID00790.3p-miR	uacacacacacacuuuccaau
miR-13-35476-3p	TJU_CMC_MD2.ID00849.3p-miR	cccccucucccccucucccacc
miR-14-31624-3p	TJU_CMC_MD2.ID00915.3p-miR	gcaggagccgggguuccggccgcg
miR-15-32047-5p	TJU_CMC_MD2.ID01041.5p-miR	gcggcggcggcggcgugggguccu
miR-15-36862-3p	TJU_CMC_MD2.ID01030.3p-miR	acacacacacaacaugcacaugc
miR-15-38620-5p	TJU_CMC_MD2.ID00978.5p-miR	gggguggggucgguggggcugg
miR-15-39164-3p	TJU_CMC_MD2.ID00968.3p-miR	ucuccgccucccgcgcgccccgc
miR-16-16153-5p	TJU_CMC_MD2.ID01099.5p-miR	gggcggcggcggccggcgggcgg
miR-16-29933-5p	TJU_CMC_MD2.ID01190.5p-miR	cggggcggcggcggcgggcggcgggg
miR-16-40261-3p	TJU_CMC_MD2.ID01184.3p-miR	gccgggagcggcgggggcgg
miR-17-12804-3p	TJU_CMC_MD2.ID01382.3p-miR	ggggcgagaaggggcggggc
miR-17-34996-5p	TJU_CMC_MD2.ID01404.5p-miR	ugaacccgagaggaagagauugc
miR-17-38733-3p	TJU_CMC_MD2.ID01344.3p-miR	ucucccacuuuccucccccuaga
miR-17-39011-3p	TJU_CMC_MD2.ID01282.3p-miR	ccuccuccgccuucgccccaacu
miR-17-39416-3p	TJU_CMC_MD2.ID01310.3p-miR	gccucgccgccgccucugcugc
miR-17-40348-5p	TJU_CMC_MD2.ID01403.5p-miR	agcggcggcagcagcggugagcg
miR-17-41168-3p	TJU_CMC_MD2.ID01323.3p-miR	gcggcggcggcgggggggugugc
miR-18-41189-3p	TJU_CMC_MD2.ID01476.3p-miR	cccggccgcccgggcccccggcc
miR-19-21199-3p	TJU_CMC_MD2.ID01702.3p-miR	agggcggcggcggcggcggcgggg
miR-19-30988-5p	TJU_CMC_MD2.ID01774.5p-miR	ggggcuggggcgggcgggcgggg
miR-19-33623-3p	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	guggcggcggcggcgggggugggg
miR-19-39380-3p	TJU_CMC_MD2.ID01633.3p-miR	ucuccgucuccaucccccagcu
miR-19-41131-3p	TJU_CMC_MD2.ID01626.3p-miR	cccgccccuccgcgccccccccc
miR-19-41914-3p	TJU_CMC_MD2.ID01705.3p-miR	gcggcagagcgggcggcgcag
miR-19-42218-3p	TJU_CMC_MD2.ID01599.3p-miR	ccccccucugucccucgucccag
miR-19-42375-3p	TJU_CMC_MD2.ID01748.3p-miR	ucucccucccccugcucccagc
miR-19-42814-5p	TJU_CMC_MD2.ID01727.5p-miR	gcacacauacaaacaaacacaca
miR-19-43065-3p	TJU_CMC_MD2.ID01768.3p-miR	ucucccuccuccuccgcucagc
miR-19-43373-3p	TJU_CMC_MD2.ID01737.3p-miR	ggcggcagcggggugaggccgg
miR-19-43644-3p	TJU_CMC_MD2.ID01560.3p-miR	cucccguccugcgccgcccucgc
miR-19-43804-3p	TJU_CMC_MD2.ID01545.3p-miR	cuccccaucucccucccccuc
miR-20-43381-5p	TJU_CMC_MD2.ID02064.5p-miR	cggagggcggcggcggcggcg
miR-20-43873-3p	TJU_CMC_MD2.ID02106.3p-miR	gcggcggccgggagucggaggca
miR-22-46979-5p	TJU_CMC_MD2.ID02187.5p-miR	gcggcggcggcggcgguuacucc
miR-X-48174-3p	TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR	uccuccgccaccuccgccccugc

Таблица 3 - Нуклеотидные последовательности ортологичных miR-135a-5p. Таблица создана самостоятельно на основе данных miRBase.

miRNA	Номер доступа	Нуклеотидная последовательность
1	2	3
hsa-miR-135a-5p	MI0000452	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
mmu-mir-135a-5p	MI0000161	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
dre-mir-135a-5p	MI0003692	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
fru-mir-135a-5p	MI0003388	UAUGGCUUUCUAUUCCUAUGUG
mdo-mir-135a-5p	MI0005297	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA

Продолжение таблицы 3

1	2	3
mze-mir-135a-5p	MI0034089	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUCUG
rno-mir-135a-5p	MI0000908	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
gga-mir-135a-5p	MI0001169	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
mml-mir-135a-5p	MI0002540	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
ptr-mir-135a-5p	MI0002541	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
ppy-mir-135a-5p	MI0002543	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
tni-mir-135a-5p	MI0003389	UAUGGCUUUCUAUUCCUAUGUG
cfa-mir-135a-5p	MI0008025	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
bta-mir-135a-5p	MI0009736	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
bfl-mir-135a-5p	MI0010502	UAUGGCUUUCAUCCUAUGUGAA
eca-mir-135a-5p	MI0012823	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
tgu-mir-135a-5p	MI0013777	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
ppy-mir-135a-5p	MI0014827	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
pma-mir-135a-5p	MI0017071	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
ola-mir-135a-5p	MI0019428	UAUGGCUUUCUAUUCCUAUGU
sha-mir-135a-5p	MI0019651	UAUGGCUUUUUAUUCCUAU
ipu-mir-135a-5p	MI0024496	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
bbe-mir-135a-5p	MI0026182	UAUGGCUUUCAUCCUAUGUGA
ssa-mir-135a-5p	MI0026485	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUCUGA
chi-mir-135a-5p	MI0030622	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
tch-mir-135a-5p	MI0031261	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA
abu-mir-135a-5p	MI0033771	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUCUGA
nbr-mir-135a-5p	MI0034322	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUCUGA
oni-mir-135a-5p	MI0034599	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUCUGA
pny-mir-135a-5p	MI0034832	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUCUGA
ggo-mir-135a-5p	MI0002542	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA

3.2 Создание баз данных по генам, связанным с раком молочной железы

В результате поиска в статьях и базе NCBI генов, участвующих в развитии рака молочной железы было выявлено 602 генов. Из них были отобраны гены, экспрессирующиеся при разных субтипах, специфичные только к каждому субтипу (таблица 4).

Таблица 4 - Кандидатные гены субтипов рака молочной железы с источниками информации, указывающие на их специфичное участие в субтипах рака молочной железы [267].

Субтип	Ген	Уровень экспрессии	Источник
1	2	3	4
HER2	*ACSS2*	30,5	doi: 10.1186/ar4486.
	ADAM10	10,4	doi: 10.1038/s41598-016-0013-4.
	ADAM17	6,0	doi: 10.1016/j.acthis.2011.03.009.
	AURKA	0,5	doi: 10.1038/s41523-017-0049-z.
	BRCA2	0,1	doi: 10.1155/2016/5718104.

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
	BRIP1	0,1	doi: 10.18632/oncotarget.7027.
	CCNE2	0,4	doi: 10.1371/journal.pone.0031422.
	CDK2	9,9	doi: 10.1093/annonc/mdr340.
	CDK4	28,1	doi: 10.2147/BCTT.S150540.
	CDK6	2,2	doi: 10.2147/BCTT.S150540.
	EPO	0,0	doi: 10.5114/aoms.2016.62723.
	EPOR	8,1	doi: 10.1007/s10549-012-2316-x.
	ERBB3 (HER3)	11,0	doi: 10.18632/oncotarget.22027.
	FKBPL (FKBP4)	2,7	doi: 10.1038/s41523-017-0049-z.
	GTF2E1	2,7	doi: 10.1016/j.cels.2017.08.013.
	H2AFX (H2AX)	7,0	doi: 10.18632/oncotarget.2259
	HBD	0,2	doi: 10.1074/jbc.M109.032714.
	LIN28B	0,0	doi: 10.1089/cbr.2014.1610.
	MAPK3 (ERK1)	32,6	doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.001.
	MAZ	9,5	doi: 10.1371/journal.pone.0026122.
	NHS	2,2	doi: 10.1002/cmmi.491.
	NISCH	32,2	doi: 10.1016/j.artmed.2016.10.003.
	PAEP	0,1	doi: 10.1007/s10549-010-1065-y.
	PARP1 (PARP)	11,2	doi: 10.1053/j.seminoncol.2017.06.006.
	PCNA	21,1	doi: 10.1634/theoncologist.2013-0163.
	RAD21	32,4	doi: 10.1186/bcr3176
	RASSF1	22,9	doi: 10.18632/oncotarget.4062
	RPLP2	800,4	doi: 10.1080/15548627.2015.1063764.
	STAR (STARD1)	0,3	doi: 10.1016/j.ajpath.2014.12.018.
	TIMP3	400,1	doi: 10.1016/j.humpath.2011.12.022.
	TNF	0,5	doi: 10.17219/acem/62120.
luminal A и B	*AKT3*	8,6	doi: 10.1002/gcc.22279.
	ANGPTL4	98,1	doi: 10.1038/ncb2672.
	EZH1	27,0	doi: 10.1371/journal.pgen.1002751.
	FOXA1	10,2	doi: 10.1038/modpathol.2017.107.
	GTF2IRD1	3,1	doi: 10.2353/ajpath.2010.090837.
	HMGA2	0,0	doi: 10.1371/journal.pgen.1002751.
	ITGA6	28,0	doi: 10.1038/ncb2672.
	ITGB1	63,6	doi: 10.1080/15548627.2016.1213928
	JAK1	39,5	doi: 10.1371/journal.pgen.1002751
	LOX	14,5	doi: 10.3390/ijms18122775.
	MAP3K14	7,0	doi: 10.1371/journal.pone.0120361.
	MAPT	3,3	doi: 10.1007/s00428-012-1357-1.
	MCM7	24,6	doi: 10.1371/journal.pgen.1002751.
	NAT1	1,0	doi: 10.1007/s10549-016-3741-z.
	PON1 (ESA)	0,1	doi: 10.1186/1476-4598-13-213.
	POSTN	23,5	doi: 10.1096/fj.201700629R.
	SMAD3	14,0	doi: 10.1074/jbc.M113.506535.
	SOX4	13,2	doi: 10.1371/journal.pgen.1002751.
	TGFB1 (TGFB)	19,5	doi: 10.1038/ncb2672.
	TP63	4,2	doi: 10.1186/s13058-015-0607-y.
triple-negative	*ANXA3*	23,2	doi: 10.1016/j.clbc.2017.11.009.

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
	ASAH1 (AC)	55,0	doi: 10.1038/bjc.2011.159
	ARHGAP19	4,6	doi: 10.1186/bcr2867.
	ATG4D	6,5	doi: 10.1038/emboj.2011.331.
	ATM	3,9	doi: 10.1007/s40262-017-0587-4.
	AXL	20,5	doi: 10.1155/2017/1686525
	BIRC5	0,1	doi: 10.1186/1756-9966-31-58.
	CBL	3,9	doi: 10.1073/pnas.1300873110.
	CD44	30,5	doi: 10.1093/protein/gzx063.
	CDC25C	0,0	doi: 10.1038/onc.2010.510.
	CEACAM5 (CEA)	0,1	doi: 10.1016/j.cca.2017.04.023.
	CLDN1	4,9	doi: 10.1186/1471-2407-13-268.
	CYP19A1	0,5	doi: 10.1007/s10552-014-0491-2.
	DRAM1	7,2	doi: 10.1016/j.febslet.2012.12.027.
	ERBB3	11,0	doi: 10.18632/oncotarget.13284.
	FGFR2	4,5	doi: 10.1007/s00428-016-1950-9.
	F2RL1 (PAR2)	1,2	doi: 10.1002/cmdc.201700640.
	FH (MCL)	22,8	doi: 10.2147/OTT.S101677.
	FIS1 (LINC01554)	49,7	doi: 10.1186/bcr3588.
	FN1	45,1	doi: 10.1186/bcr2867.
	HN1 (CCDC110)	4,5	doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.049.
	IAPP (IAP)	0,0	doi: 10.18632/oncotarget.20227.
	IL-11	0,1	doi: 10.1371/journal.pone.0037361.
	JHDM1D (KDM7A)	8,0	doi: 10.1002/ijc.27629.
	LAMC1	63,4	doi: 10.1016/j.molonc.2012.03.003.
	LAMTOR5 (HBXIP)	39,7	doi: 10.1002/ijc.28154.
	LASP1	26,0	doi: 10.1186/1756-9966-31-58.
	LEPR	6,5	doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.010.
	MAGEA10	0,0	doi: 10.1016/j.acthis.2014.01.003.
	MDK	26,6	doi: 10.1007/s13277-015-3710-x.
	MID1	3,6	doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.046.
	MMP2	192,4	doi: 10.1038/srep28623.
	MSN	74,3	doi: 10.1186/bcr2867.
	MTCH2	14,4	doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.046.
	MTSS1 (MLRL)	9,3	doi: 10.1186/s12935-017-0399-5.
	MYL9	461,9	doi: 10.1002/ijc.27629.
	NTRK2	7,9	doi: 10.1186/bcr2867.
	PARP1	11,2	doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.032.
	PFN1	149,1	doi: 10.1080/15384101.2017.1346759.
	PRKCE	1,8	doi: 10.1038/onc.2013.91.
	PRRT2 (PKC)	6,7	doi: 10.1002/cmdc.201700640.
	PTGS2 (COX2)	1,6	doi: 10.1073/pnas.1709119114.
	RAB5A	16,1	doi: 10.1038/emboj.2011.331.
	RPSA (SA)	231,1	doi: 10.1073/pnas.1005978107.
	RUNX1	9,0	doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.032.
	SERPINE1 (PAI1)	39,4	doi: 10.1186/1471-2407-13-268.
	SFN	9,4	doi: 10.1073/pnas.1315022110.
	STMN1	6,6	doi: 10.3892/ijo.2017.4085.

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
	TBP	7,8	doi: 10.1002/ijc.28154.
	TLR4 (TLR-4)	8,7	doi: 10.1002/ijc.27629.

3.3 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов семейства E2F, связанных с развитием РМЖ

В mRNA гена *E2F1* имеются сайты связывания 25 разных miRNA, из которых 13 расположены в 5'UTR (таблица 5). Восемь miRNA имеют сайты связывания в CDS и пять miRNA в 3'UTR, что подтверждает явное предпочтение связывания miRNA в начале mRNA. В 5'UTR mRNA гена *E2F1* локализован кластер сайтов связывания 12 miRNA в участке длиной 33 нуклеотидов (нт) с 83 нт по 116 нт (таблица 6). Пять miRNA имеют более двух сайтов связывания в этом участке. Увеличение вероятности связывания miRNA с mRNA происходит благодаря наличию множественных сайтов связывания. При последовательном расположении сайтов связывания 12 miRNA общая длина их равна 522 нт, которая значительно больше длины 5'UTR mRNA гена *E2F1* составляющей 140 нт. Расположение сайтов связывания половины miRNA в 5'UTR имеет следующий смысл. Поскольку функция miRNA заключается в торможении процесса трансляции, то логично miRNA связываться в 5'UTR, чтобы синтез белка не начинался. Из восьми miRNA, связывающихся в CDS, пять имели сайты связывания в участке до 400 нт. при общей длине CDS равной 1313 нт (таблица 5). То есть, и в этом случае торможение трансляции начинается раньше, поскольку имеется вероятность появления абортивных полипептидов, на синтез которых тратится энергия. С mRNA гена *E2F1* комплементарно связываются miR-8-24509-3p, miR-20-23817-3p и miR-20-45152-5p (ΔG/ΔGm равна 100%). То есть, эти miRNA могут более эффективно блокировать трансляцию mRNA *E2F1* (таблица 5). mRNA гена *E2F2* имеет сайты связывания для пяти miRNA в 3'UTR и для трех в CDS. Ни для одной miRNA не было множественных сайтов связывания. Сайты связывания miR-1-875-3p и miR-760 располагались с наложением (таблица 5).

Таблица 5 - Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов *E2F1*, *E2F2* [268-271].

miRNA	Начало сайтов, нт	Участок mRNA	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
mRNA гена *E2F1*					
1	2	3	4	5	6
miR-1-1714-3p	90	5’UTR	-117	93	20
miR-1-1714-3p	381	CDS	-119	95	20
miR-2-3313-3p	91	5’UTR	-138	87	25
miR-2-4453-3p	87	5’UTR	-123	94	21
miR-4-11239-3p	84	5’UTR	-115	93	20

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
miR-6-17487-3p	1642	3’UTR	-113	90	23
miR-8-24509-3p (4)	90 ÷ 97	5’UTR	-93 ÷ -108	86 ÷ 100	17
miR-10-5299-5p	290	CDS	-115	95	19
miR-10-13655-3p (3)	87 ÷ 93	5’UTR	-117 ÷ -119	86 ÷ 87	22
miR-12-5800-5p (3)	83÷ 90	5’UTR	-104 ÷ -113	86 ÷ 93	20
miR-12-6056-3p (5)	87 ÷ 97	5’UTR	-89 ÷ -93	86 ÷ 90	17
miR-16-36797-3p	1382	CDS	-115	93	22
miR-17-36033-3p	446	CDS	-129	87	25
miR-19-21199-3p	90	5’UTR	-138	88	25
miR-20-23817-3p	290	CDS	-153	100	24
miR-20-43381-5p (3)	90 ÷ 97	5’UTR	-113 ÷ -119	85 ÷ 90	21
miR-20-45152-5p	85	5’UTR	-149	100	24
miR-21-40861-3p	2178	3’UTR	-110	90	22
miR-22-44137-3p	764	CDS	-115	89	23
miR-1913	29	5’UTR	-115	90	22
miR-3960	88	5’UTR	-115	92	20
miR-4749-3p	2322	3’UTR	-108	91	20
miR-6511b-3p	2326	3’UTR	-121	93	23
miR-6786-5p	267	CDS	-115	90	21
miR-6813-3p	2537	3’UTR	-108	91	21
miR-X-44865-3p	292	CDS	-115	92	20
mRNA of *E2F2*					
miR-1-875-3p	623	CDS	-115	90	22
miR-2-4804-5p	4107	3’UTR	-113	90	24
miR-17-34996-5p	4165	3’UTR	-110	90	23
miR-760	624	CDS	-106	93	20
miR-1273g-3p	4127	3’UTR	-113	96	21
miR-1273f-3p	4160	3’UTR	-96	92	19
miR-4539	1406	CDS	-113	90	22
miR-5684	4121	3’UTR	-98	92	20
*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA; ÷ - изменение параметра в интервале.					

Сайты связывания miR-2-4804-5p, miR-5684, miR-1273g-3p локализованы в отрезке длиной 41 нт, а miR-1273f, miR-17-34996-5p локализованы в отрезке длиной 28 нт при общей длине 3'UTR равной 3452 нт (таблица 6). То есть, в области 3'UTR mRNA генов сайты связывания miRNA тоже могут располагаться в виде кластера, несмотря на большую длину 3'UTR.

На данных, приведенных в таблице 7, продемонстрированно, что гептапептид TPHGPEG, кодируемого сайтами связывания miR-1-875-3p и miR-760-3p, является консервативным у 18 видов животных, что указывают на стабильность miR-1-875-3p и miR-760-3p с экспрессией гена *E2F2*, и устойчивость на протяжении десятков миллионов лет дивергенции видов в процессе эволюции.

Таблица 6 - Характеристики сайтов связывания miRNA, образующих кластеры, в mRNA генов *E2F1, E2F2, E2F5* и *E2F8* [272].

miRNA	Начало сайта связывания, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина miRNA, нт
Сайты связывания в 5'UTR mRNA гена *E2F1*				
miR-12-5800-5p (3)	83 ÷ 90	-104 ÷ -113	86 ÷ 93	20
miR-4-11239-3p	84	-115	93	20
miR-2-3313-3p	84	-136	85	25
miR-20-45152-5p	85	-149	100	24
miR-2-4453-3p	87	-123	94	21
miR-10-13655-3p (3)	87 ÷ 93	-104 ÷ -113	86 ÷ 87	22
miR-12-6056-3p (5)	87 ÷ 97	-89 ÷ -93	86 ÷ 90	17
miR-3960	88	-115	92	20
miR-1-1714-3p	90	-117	93	20
miR-8-24509-3p (4)	90 ÷ 97	-93 ÷ -108	86 ÷ 100	17
miR-19-21199-3p	90	-138	88	25
miR-20-43381-5p (3)	90 ÷ 97	-108	85 ÷ 90	21
miR-2-3313-3p	91	-138	87	25
Сайты связывания в 3'UTR mRNA гена *E2F2*				
miR-2-4804-5p	4107	-113	90	24
miR-5684	4121	-98	92	20
miR-1273g-3p	4127	-113	96	21
miR-1273f-3p	4160	-96	92	19
miR-17-34996-5p	4165	-110	90	23
Сайты связывания в CDS mRNA гена *E2F5*				
miR-9-26166-3p	66	-113	90	22
miR-8-24124-3p	71	-115	92	22
miR-16-37595-3p	84	-115	90	22
miR-12-5800-5p (2)	91÷ 97	-104 ÷ -110	86 ÷ 91	20
miR-2-3313-3p	92	-142	89	25
miR-6068	103	-110	90	22
Сайты связывания в 3'UTR mRNA гена *E2F8*				
miR-3-5147-5p (9)	3278 ÷ 3294	-96 ÷ -100	87 ÷ 90	22
miR-101-27078-5p (7)	3284 ÷ 3296	-104 ÷ -108	86 ÷ 89	23
miR-574-5p (4)	3285 ÷ 3291	-113	93	23
*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.				

Сайты связывания miR-760-3p и miR-1-875-3p были определены в области 15% с начала в CDS.

Таблица 7 - Консервативность гептапептида TPHGPEG, кодируемого сайтами связывания miR-760-3p и miR-1-875-3p в гене mRNA *E2F2* [272, с. 10-18].

Участок белка E2F2	Объекты
1	2
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Hsa*

Продолжение таблицы 7

1	2
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Ppa*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Mml*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Nle*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Chi*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Fca*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Ptr*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Oar*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Pab*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Rro*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Cja*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Ggo*
APGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Lve*
ASGTCLDA**TPHGPEG**QVVRCLPA	*Mfa*
APGTCLDA**TPHGPEG**QAVRCVPA	*Ame*
AAGTCLDA**TPHGPEG**QAVRCVPA	*Cfa*
ALGTCLDA**TPHGPEG**QIVRCVPA	*Rno*
ALGTCLDA**TPHGPEG**QIVRCVPA	*Mmu*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначен консервативный гептапептид, кодируемый сайтом связывания с miR-760-3p и miR-1-875-3p	

Эти сайты связывания miRNA были определены в mRNA гена *E2F2* крысы, мыши, поэтому эти животные могут быть использованы в экспериментах по изучению действия miR-760-3p и miR-1-875-3p.

Тридцать семь miRNA имели сайты связывания с mRNA гена *E2F3*. Все miRNA связывались в белок-кодирующей области, кроме miR-7-19239-3p, которая имела сайты связывания в 5’UTR, miR-1-2558-3p и miR-5-16871-5p в 3'UTR.

Уникальность гена *E2F3* состоит в том, что только его mRNA содержала множественные сайты связывания для 22 miRNA в белок-кодирующей области из всех изученных нами mRNA 17494 генов человека. Значительное увеличение вероятности взаимодействия с mRNA гена *E2F3* демонстрируют miR-8-24509-3p и miR-2-4453-3p, которые имеют 13 и 12 сайтов связывания, соответственно. С 389 нт по 486 нт на участке длиной 97 нт располагаются сайты связывания 27 miRNA. Общая длина этих miRNA равна 567 нт и при длине CDS равной 1398 нт гену обременительно «содержать» такое число нуклеотидов для связывания miRNA. Длина остальных miRNA составляет 203 нт и, учитывая множественные сайты связывания, общая длина всех сайтов сравнима с длиной CDS. В белок-кодирующей области гена *E2F3*, начиная с 691 нт, имеется еще один кластер сайтов связывания miR-3-9439-3p, miR-9-20317-3p, miR-17-39416-3p и miR-5-15564-3p, длиной 28 нт (таблица 8). В процессе эволюции было выработано уплотнение сайтов связывания в виде кластеров. Это стало возможным благодаря высокой специфичности miRNA, селективно узнающих сайты связывания.

Возникает впечатление, что белок E2F3 совсем не будет синтезироваться, благодаря такому количеству miRNA, потенциально взаимодействующих с mRNA гена *E2F3*. Однако, в одно и то же время и в каждой клетке не все miRNA могут синтезироваться. Кроме этого, концентрация miRNA должна быть сравнима с концентрацией mRNA, чтобы уменьшалось число свободной mRNA и проявился эффект подавления трансляции.

Таблица 8 - Характеристики связывания miRNA с CDS mRNA гена *E2F3* [272, с. 10-18; 273, 274].

miRNA	Начало сайта связывания, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина miRNA, нт
miR-2-3313-3p (8)	389 ÷ 462	-136 ÷ -142	85 ÷ 89	25
miR-9-5204-5p (5)	390 ÷ 463	-115 ÷ -121	86 ÷ 90	22
miR-3-8100-5p (5)	391 ÷ 461	-125 ÷ -136	86 ÷ 93	24
miR-2-4453-3p (12)	392 ÷ 467	-113 ÷ -121	85 ÷ 92	21
miR-8-24509-3p (13)	395 ÷ 468	-93 ÷ -102	86 ÷ 94	17
miR-12-6056-3p (9)	396 ÷ 468	-89 ÷ -98	86 ÷ 92	17
miR-4-6496-3p (5)	401 ÷ 473	-110 ÷ -119	85 ÷ 92	21
miR-2-6409-5p (6)	404 ÷ 470	-91 ÷ -98	86 ÷ 92	17
miR-4-11923-3p (3)	405 ÷ 468	-115 ÷ -129	86 ÷ 97	22
miR-2-4005-5p	448	-132	89	24
miR-1-2121-3p (8)	449 ÷ 462	-134 ÷ -140	85 ÷ 89	25
miR-17-42540-3p	449	-115	92	20
miR-19-33623-3p (4)	450 ÷ 462	-127 ÷ -129	86 ÷ 87	24
miR-1-155-3p (7)	452 ÷ 470	-119 ÷ -132	86 ÷ 95	22
miR-152047-3-5p (4)	452 ÷ 461	-125 ÷ -127	86 ÷ 87	24
miR-19-21199-3p (8)	452 ÷ 464	-134 ÷ -144	85 ÷ 92	25
miR-17-40348-5p	454	-123	91	23
miR-9-28523-5p(4)	455 ÷ 464	-113 ÷ -117	90 ÷ 93	20
miR-10-13655-3p (6)	455 ÷ 467	-119 ÷ -121	87 ÷ 89	22
miR-5-16438-3p	457	-115	87	22
miR-17-41310-3p (6)	459 ÷ 471	-98 ÷ -100	85 ÷ 87	18
miR-19-43966-3p(3)	459 ÷ 471	-121	86	23
miR-20-43381-5p (5)	459 ÷ 471	-113 ÷ -125	85 ÷ 95	21
miR-22-23987-3p (4)	461 ÷ 473	-113 ÷ -119	85 ÷ 90	21
miR-3-9461-3p	461	-121	89	23
miR-16-13062-5p	465	-132	89	24
miR-7-15849-3p (3)	469 ÷ 478	-98 ÷ -104	85 ÷ 91	18
miR-3-9439-3p (3)	691 ÷ 703	-98	87	18
miR-9-20317-3p	691	-136	91	24
miR-17-39416-3p	692	-123	94	22
miR-5-15564-3p	696	-134	97	22

*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Необходимо учитывать, что одновременная экспрессия miRNA в данной клетке в данное время не может происходить, потому что, примерно,

половина всех miRNA имеют интронное происхождение и синтезируются одновременно с хозяйским геном. Еще одним фактором, уменьшающим связывание miRNA, является наложение сайтов связывания для многих miRNA. В качестве примера, участок mRNA с 389 нт по 486 нт содержит сайты связывания для 26 miRNA, каждая из которых конкурирует за сайты связывания с mRNA с учетом энергии связывания и концентрации (Таблица 8). miR-19-42593-3p имела сайт связывания в области mRNA от 371 до 420 нт. Этот сайт связывания miR-19-42593-3p кодировал олигопептид AAVVAAAAAA (Таблица 9).

Таблица 9 - Консервативность декапептида AAVVAAAAAA кодируемого сайтом связывания miR-19-42593-3p в mRNA *E2F3* гена [272, с. 10-18; 273, с. 15; 274, с. 380-381].

Участок белка E2F3	Объекты
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Hsa*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Lve*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Ptr*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Mne*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Pab*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Nle*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Bta*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Csa*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Oar*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Cgr*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Mmu*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDKRALL	*Pal*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAAA**SMDKRALL	*Nga*
VTAGGGEG**AAAAAAAAAA.**SMDKRALL	*Mdo*
VTAGGGEG**AAVVAAAAAA.**SMDTAGSLL	*Ggo*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначен консервативный декапептид, кодируемого сайтом связывания miR-19-42593-3p с mRNA	

Ген *E2F4* человека содержал сайты связывания для восьми miRNA. По две miRNA связывались в 5'UTR и 3'UTR, четыре miRNA связывались в CDS. Для miR-9-25681-5p имелись множественные сайты связывания. miR-11-23098-5p и miR-19-43662-5p связывались в 3’UTR mRNA с частичным совпадением сайтов связывания.

miR-1322 имела сайты связывания, которые кодировали олигопептид из 21 аминокислот, преимущественно серина (таблица 10). Следует отметить, что белки E2F4 крысы и мыши имели меньшее число аминокислот в олигопептиде, который состоял только из серина. Следовательно, *R. norvegicus* и *M. musculus* не могут быть адекватной моделью при изучении роли miR-1322 в регуляции экспрессии гена *E2F4*.

Олигопептиды, фланкирующие олигопептид, кодируемого сайтами связывания miR-1322, были высоко консервативны, что отражает не

обязательность строгого постоянства длины и состава нуклеотидов в сайтах связывания miR-1322 (таблица 10).

Таблица 10 - Аминокислотные последовательности, кодируемые сайтами связывания miR-1322 ортологичных генов *E2F4* [272, с. 10-18].

Область аминокислотных последовательностей *E2F4*	Объекты
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSSNSSSLS**GPNPSTSFEP	*Pan*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSSNSSSSS**GPNPSTSFEP	*Rro*
RPLQSSALLD**SSSSSSTSSSSSTSSSSSTSSSS**GPNPSTSFEP	*Hgl*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSNSSSLS-**GPNPSTSFEP	*Csa*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSNSSSLS-**GPNPSTSFEP	*Mml*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSNSSSLS-**GPNPSTSFEP	*Mfa*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSNSNSSSSS--**GPNPSTSFEP	*Hsa*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSNSSSLS--**GPNPSTSFEP	*Mne*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS--**GPNPSTSFEP	*Cgr*
RPLQSSALLD**SSSSSSSNSSSSSSNSSSSS---**GPNPSDSFEP	*Cja*
RPLQSSALLD**SSSSSSSNSSSSSSNSSSSS---**GPNPSTSFEP	*Sbo*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSSSS----**GPNPSTSFEP	*Rno*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSNSNSNSSSSS----**GPNPSTSFEP	*Pab*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSASSSS-----**EPNPSTSFEP	*Cpo*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSNSSSS-----**GSNPSTSFEP	*Pal*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSNNSNSSSSS------**GPNPSTSFEP	*Ppa*
RPLQSSALLD**SSSSSSSSSSSSSSSSS------**GPNPSTSFEP	*Mmu*

Ген *E2F5* человека содержал сайты связывания для девяти miRNA в CDS (таблица 6). miR-12-5800-5p имела два сайта связывания, за счет чего имеется преимущество этой miRNA в конкурентном связывании с mRNA гена *E2F5*.

Сайты связывания шести miRNA с общей длиной 132 нт занимали с 66 нт участок из 59 нт при длине CDS равной 1040 нт (таблица 6). Как и для других членов семейства транскрипционных факторов *E2F* этот кластер существенно уменьшил долю нуклеотидов в белок-кодирующей области mRNA генов.

Таблицы 11-15 демонстрируют консервативность олигопептидов в белке E2F5.

Таблица 11 - Вариабельность гептапептида PQPQPPQ, кодируемого сайтом связывания miR-6068 с mRNA *E2F5* гена [272, с. 10-18].

Участок E2F5	Объекты
1	2
QGQGQR**PPPQPPQ**AQAPQP	*Hsa*
QGQGQR**PPPQPPQ**AQAPQP	*Ggo*
QGQGQR**PPPHPPQ**AQAPQP	*Nle*
QGQGQR**PQPQPPQ**AQAPQP	*Ptr*
QGQGQR**PQPQPPQ**AQAPQP	*Mml*
QGQGQR**PQPQPPQ**AQAPQP	*Csa*

Продолжение таблицы 11

1	2
QGQDQR**PQPQPPQ**AQAPQP	*Cja*
QGQGQR**PQPQPSQ**AQPPQQ	*Ame*
QGQGQR**PQPPQPQ**PPQQPP	*Laf*
QGQGQR**PQPQQSQ**AQPPPP	*Lve*
QGQGQR**PQPPPSQ**AQPPPP	*Ssc*
QGQGQR**PQ**A**Q**S**PQ**AQAPQP	*Rro*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначен консервативный гептапептид, кодируемого сайтом связывания miR-6068 с mRNA	

Таблица 12 - Консервативность гептапептида APQPPPP, кодируемого сайтом связывания miR-7-19239-3p с mRNA *E2F5* гена [272, с. 10-18].

Участок E2F5	Объекты
QPPQAQ**APQPPPP**PQLGGA	*Hsa*
QPPQAQ**APQPPPP**PQLGGA	*Ptr*
QPPQAQ**APQPPPP**PQLGGA	*Mml*
QPPQAQ**APQPPPP**PQLGGA	*Csa*
QPPQAQ**APQPPPP**QQLGGA	*Ggo*
HPPQAQ**APQPPPP**PQLGGA	*Nle*
QSPQAQ**APQPPP.**LQLGGA	*Rro*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначен консервативный гептапептид, кодируемого сайтом связывания miR-7-19239-3p с mRNA	

Таблица 13 - Консервативность гептапептидов, кодируемых сайтами связывания miR-9-26166-3p, miR-8-24124-3p, miR-16-37595-3p с mRNA *E2F5* гена [272, с. 10-18].

Участок E2F5			Объекты
miR-9-26166-3p	miR-8-24124-3p	miR-16-37595-3p	
AEPASS**GQQAPAG**QGQGQR	PASSGQ**QAPAGQG**QGQRPP	GQQAPA**GQGQGQR**PPPQPP	*Hsa*
AEPASS**GQQAPAG**QGQGQR	PASSGQ**QAPAGQG**QGQRPQ	GQQAPA**GQGQGQR**PQPQPP	*Ptr*
AEPASS**GQQAPAG**QGQGQR	PASSGQ**QAPAGQG**QGQRPP	GQQAPA**GQGQGQR**PPPHPP	*Nle*
AEPASS**GQQAPPG**QGQGQR	PASSGQ**QAPPGQG**QGQRPQ	GQQAPP**GQGQGQR**PQPQPP	*Mml*
AEPASS**GQQAPPG**QGQGQR	PASSGQ**QAPPGQG**QGQRPP	GQQAPP**GQGQGQR**PPPQPP	*Ggo*
AEPASS**GQQAPPG**QGQDQR	PASSGQ**QAPPGQG**QDQRPQ	GQQAPP**GQGQDQR**PQPQPP	*Cja*
AEPASS**GQQAPPG**QGQGQR	PASSGQ**QAPPGQG**QGQRPQ	GQQAPP**GQGQGQR**PQPQPP	*Csa*
AEPASS**GQQAPPG**QGQGQR	PASSGQ**QAPPGQG**QGQRPQ	GQQAPP**GQGQGQR**PQAQSP	*Rro*
AEPASS**GQQAPQG**QGQGQR	PASSGQ**QAPQGQG**QGQRPQ	GQQAPQ**GQGQGQR**PQPPQP	*Laf*
VLALRA**GQQAPQG**QGQGQR	ALRAGQ**QAPQGQG**QGQRPQ	GQQAPQ**GQGQGQR**PQPQPS	*Ame*
AEPGGS**GQPAPQG**QGQGQR	PGGSGQ**PAPQGQG**QGQRPQ	GQPAPQ**GQGQGQR**PQPQQS	*Lve*
AEPASS**GQPAPEG**QGQGQR	PASSGQ**PAPEGQG**QGQRPQ	GQPAPE**GQGQGQR**PQPPPS	*Ssc*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначены консервативные гептапептиды, кодируемые сайтами связывания miR-9-26166-3p, miR-8-24124-3p, miR-16-37595-3p с mRNA			

Таблица 14 - Консервативность гептапептида LLQEAKD, кодируемого сайтом связывания miR-6791-3p с mRNA *E2F5* гена [272, с. 10-18].

Участок E2F5	Объекты
TTKFVS**LLQEAKD**GVLDLK	*Hsa, Ggo, Ptr, Mml, Cja, Uma, Fca, Pab, Tch, Ssc, Sbo, Ame, Csa, Rro, Lve, Laf, Mdo, Nga, Mmu*
TAKFVS**LLQEAKD**GVLDLK	*Bta*
TTNFVS**LLQEAKD**GVLDLK	*Nle*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначен консервативный гептапептид, кодируемого сайтом связывания с miR-6791-3p	

Таблица 15 - Вариабельность октапептида GGAGGGSS, кодируемого сайтом связывания miR-18-39953-5p с mRNA *E2F5* гена [272, с. 10-18].

Участок E2F5	Объекты
PPPPQL**GGAGGGSS**RHEKSL	*Hsa, Ptr, Nle, Csa, Rro*
PPPPPL**GGAGGGSS**RHEKSL	*Ggo*
PPPQQL**GGAGGGSS**RHEKSL	*Mml*
PSQQQL**GGAGGGSS**RHEKSL	*Sbo*
PSQQQL**GGVGGGSS**RHEKSL	*Cja*
TPPPQF**GGVGGGSS**RHEKSL	*Hgl*
PPPPPL**GGGGGGSS**RHEKSL	*Lve*
PPQQPL**GGGGGGSS**RHEKSL	*Ssc*
PPPPQL**GGGGGGG-**RHEKSL	*Ame*
AAPPGN**GGGGSSS-**RHEKSL	*Mdo*
PPQQLA**GGGSS---**RHEKSL	*Tch*
ASCAPP**GAGSS---**RHEKSL	*Bta*
PSAALA**GGSS----**RHEKSL	*Mmu*
QPPRVR**GGSS----**RHEKSL	*Fca*
RSSGRR**GGSS----**RHEKSX	*Pab*
*Примечание. Жирным шрифтом обозначен консервативный гептапептид, кодируемого сайтом связывания с miR-18-39953-5p	

mRNA гена *E2F6* содержала три сайта связывания miRNA в 3’UTR и один в 5’UTR. Нуклеотидные последовательности сайтов связывания miR-19-43065-3p в mRNA гена *E2F6* показаны в таблице 16. Сайты связывания miR-19-43065-3p были полностью гомологичны у *H. sapiens, P. troglodytes, N. leucogenys, P. paniscus,* у остальных видов лишь одно нуклеотидное замещение. Сайты связывания miRNA с mRNA гена *E2F6* оставались неизменными в течение десятков миллионов лет, что указывает на стабильность регуляции экспрессии с помощью miRNA гена *E2F6*.

Таблица 16 - Нуклеотидные последовательности сайтов связывания miR-19-43065-3p в 5'UTR mRNA гена *E2F6* [272, с. 10-18].

Нуклеотидные последовательности	Объекты
1	2
GUGCUCGA**GCUGAGCGCGAGAGGGCGGGAGA**GCUCGUGG	*Hsa, Ptr, Nle, Ppa, Pab*

Продолжение таблицы 16

1	2
GUGCUCGA**GC**U**GAGUGCGAGAGGGCGGGAGA**GCUCGUGG	*Ggo*
GUGAUCGA**GC**U**G**G**GCGCGAGAGGGCGGGAGA**GCUCGCAG	*Rro, Rbi*
GUGAUCGA**GC**U**G**G**GCGCGAGAGGGCGGGAGA**GCUCGCGG	*Csa*
GUGAUCGA**GC**U**G**C**GCGCGAGAGGGCGGGAGA**GCUCGCGG	*Pan, Mml, Mfa*
GCGCUCGA**GC**UA**GGCGCGAGAGGGCGGGAGA**GCUCUCGG	*Cja*
*Примечание. Жирным шрифтом выделены сайты связывания для miR-19-43065-3p	

mRNA гена *E2F7* содержала сайты связывания для miR-14-34881-3p в CDS. Нуклеотидные последовательности сайта связывания miR-14-34881-3p в mRNA гена *E2F7* показаны в таблице 17. Сайты связывания с miR-14-34881-3p полностью гомологичны у *H. sapiens, R. roxellana, C. sabaesus, P. anubis*. В mRNA гена *E2F7* остальных видов сайты связывания для этой miRNA имели только одну замену нуклеотидов. То есть в течение процесса эволюции эти сайты связывания для miR-14-34881-3p с mRNA гена *E2F7* сохранились, указывая, что способ регулирования экспрессии гена *E2F7* с помощью этой miRNA является стабильным.

Сайты связывания miRNA, расположенные в 5'UTR, были обнаружены только у обезьян. У других животных эти сайты связывания были сильно изменены или отсутствовали.

Таблица 17 - Нуклеотидная последовательность сайтов связывания miR-14-34881-3p в 5'UTR mRNA гена *E2F7* [272, с. 10-18].

Нуклеотидная последовательность	Объекты
UGCCCGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Hsa*
UGUCGGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Csa*
UGUCGGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Rro*
UGUUGGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Pan*
UGCCCGGACG**CC**A**CGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Ggo*
UGCCCGGACG**CC**A**CGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Ppa*
UGCCCGGACG**CC**A**CGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Ptr*
UACACGGACG**CC**A**CGGGG**U**CCCCGCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Nle*
UGUCGGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAG**U**CCAG**GGCACUCGGC	*Mfa*
UGUCGGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAG**U**CCAG**GGCACUCGGC	*Mml*
UGUCGGGACG**CCGCGGGG**U**CCCCGCCAG**U**CCAG**GGCACUCGGC	*Mne*
UGCCCGGACG**CCGCGGGG**U**CCC**A**GCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Cja*
UGCCCGGACG**CCGCGGGG**U**CCC**A**GCCAGCCCAG**GGCACUCGGC	*Sbo*
*Примечание. Жирным шрифтом выделены сайты связывания с miR-14-34881-3p	

Три miRNA, связывающиеся с mRNA гена *E2F8,* имеют множественные сайты связывания и образуют кластер длиной 42 нт, локализованный в 3’UTR (таблица 6). Расположение кластеров сайтов связывания в 3’UTR свидетельствует о том, что и в этом участке mRNA необходима экономия нуклеотидной последовательности. Кластерная организация сайтов

связывания необходима и для осуществления конкуренции miRNA за связывание с mRNA гена мишени, так как связывание одного комплекса RISC будет препятствовать связыванию другого комплекса RISC с иной miRNA.

3.4 Характеристики сайтов связывания miR-1322 с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы

Установлено, что miR-1322 связывалась с генами *AFF3, AR, ARID3B, NCOA3, NCOR2, SMARCA2* в белок-кодирующей области, образуя полисайты (таблица 18). Сайты связывания miR-1322 с mRNA гена *AFF3* локализовывались в белок кодирующей части, полисайты которого содержали полисерин (таблица 19)

Таблица 18 - Характеристики сайтов связывания miR-1322 с CDS mRNA генов *AFF3, AR, ARID3B, NCOA3, NCOR2, SMARCA2* [275-279].

Ген	Начало сайтов, нт	ΔGm, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %
Hsa-AFF3 (5)	1472 ÷ 1487	-87 ÷ -89	85 ÷ 87
Hsa-AFF3 (3)	3722	-87	85
Hsa-AR (17)	1287 ÷ 1335	-89	87
Hsa-AR	1367	-89	87
Hsa-ARID3B (5)	214 ÷ 226	-89	87
Hsa-ARID3B (3)	1788 ÷ 1797	-87 ÷ -89	85 ÷ 87
Hsa-NCOA3 (11)	4003 ÷ 4066	-89	87
Hsa-NCOR2 (7)	1813 ÷ 1831	-89 ÷ -91	87 ÷ 90
Hsa-SMARCA2 (14)	760 ÷ 811	-87 ÷ -89	85 ÷ 87
*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miR-1322. ÷ - изменение параметра в интервале.			

В первом полисайте находились сайты связывания miR-1322, где взаимодействие miR-1322 с mRNA генов *AFF3* человека и *R. roxellana, C. sabaeus, P. troglodytes, N. leucogenys, M. fascicularis, P. paniscus* были с одинаковыми характеристиками взаимодействия.

Три сайта связывания с идентичными характеристиками находились во втором полисайте. У человека и *C. jacchus, M. musculus, P. troglodytes* в mRNA гена *AFF3* были близкие характеристики сайтов связывания с miR-1322.

Между двумя не вариабельными пентапептидом PSSKG и тетрапептидом DSES кодировались олигопептиды, которые находились в первом полисайте. У человека и тринадцати изученных видов животных кодирование консервативного полипептида происходило во втором сайте связывания (таблица 19).

Полученные результаты показывают, что у видов *C. sabaeus, C. jacchus, M. fascicularis, N. leucogenys, P. paniscus, P. troglodytes, R. roxellana, S. boliviensis* сайты связывания miR-1322 в mRNA гена *AFF3* идентичны таковым у человека.

Таблица 19 - Вариабельность аминокислот в участках белка AFF3, содержащего олигопептиды кодируемые полисайтом I и полисайтом II связывающими miR-1322 [275, с. 30-41].

Номера полисайтов	Аминокислоты участка белка AFF3	Объекты
Полисайт I	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Hsa*
	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Rro*
	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Csa*
	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Ptr*
	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Nle*
	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Mfa*
	TSVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Ppa*
	ASVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Cja*
	ASVPSSKG**SSSSSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Sbo*
	ASVPSSKG**SSSGSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Laf*
	GSVPSSKG**SSSGSSSGSSSSSS**DSESSSGS	*Nga*
	ASVPSSKG**SSSGSSSSGSSSSS**DSESSSGS	*Cfa*
	ASAPSSKG**SSSGSSSSGSSSSS**DSESSSGS	*Bta*
	ASAPSSKG**SSSGSSSSGSSSSS**DSESSSGS	*Chi*
	GSAPSSKG**GGSSSSSGGSSSSS**DSESTSGS	*Mmu*
Полисайт II	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Hsa*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Cja*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Sbo*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Csa*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Ptr*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Nle*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Mfa*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Cfa*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Nga*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Bta*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Ppa*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Chi*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Laf*
	SKEFIETE**SSSSSSSS**DSDLESEQ	*Mmu*
*Примечание: здесь и в других таблицах жирным выделены олигопептиды, кодируемые сайтами связывания miRNA		

В mRNA гена *AR* при взаимодействии с miR-1322 сайты связывания кодировали полиглутамин (таблица 20). Это объясняется тем, что нуклеотидная последовательность cagcagcagcagcagcagcag сайта связывания может транслироваться в трех рамках считывания, где первой рамке считывания будет соответствовать олигопептид QQQQQQQ, второй рамке считывания – олигопептид SSSSSSS, а третьей рамке считывания – олигопептид AAAAAAA.

Предположение о том, что нуклеотидная последовательность сайта связывания может кодировать олигопептид в трех рамках считывания подтверждено при изучении связывания miR-1322 с mRNA 48 генов человека

и других miRNA [278, с. 1-7]. Характеристики связывания miR-1322 с mRNA гена *AR H. sapiens*, *E. caballus* и *L. vexillifer* были близки.

Полученные данные свидетельствуют о большом сходстве характеристик взаимодействия miR-1322 с mRNA гена *AR* у изученных видов животных. Однако, между двух фланкирующих олигопептидов PPGASL и ETSPR изменялось число сайтов связывания miR-1322 и длина полиглутамина. Между фланкирующими олигопептидами ETSPR и GEDGSPQAH содержалось от четырех до одинадцати остатков глутамина (таблица 20).

Таблица 20 - Вариабельность аминокислот в участках белка AR, содержащих олигопептиды кодируемые двумя полисайтами связывающими miR-1322 [275, с. 30-41].

Аминокислоты участка белка AR	Объекты
PPGASLLLLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQ.....GEDGSPQAH	*Hsa*
PPGASLLL..QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQ......GEDGSPQAH	*Ptr*
PPGARL........QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQQ....TEDGSPQAQ	*Ocu*
PPGARL.........QQQQQQQQQQQQQQQQQQ.................GDNGSPQAQ	*Ame*
PPGASLLL..........QQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQ......GEDGSPQAH	*Ppa*
PPGASLLL..........QQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQ......GEDGSPQAH	*Bmu*
PPGAHL................QQQQQQQQQQETSPRQQQQQQQ....GDDGSPQAQ	*Cfa*
PPGARL..................QQQQQQQQQEQTSPQQQQQQQQQQQSEDGSPQAQ	*Fca*
PPGASL..................QQQQQQQQETSPRQQQQQQQ....GEDGSPQAH	*Mml*
PPGARLK.................QQQQQQQQEEISPRQQQQQQ....GEDGSPQAQ	*Laf*
PPGARL..................QQQQLQQQETSPRRQQQQQQQP..SEDGSPQVQ	*Ssc*
PPGARL.....................QQQQQQETSPQQQQQQQQQQQ.SEDGSPQVQ	*Bac*
PPGASL.....................QQQQHTSPRQQQQ.......GEDGSPQVH	*Cja*
PPGACL.....................QQRQETSPRRRRRQQH....PEDGSPQAH	*Rno*

Примерно через 200 нуклеотидов от данного полисайта расположился третий полисайт белка AR, который кодировал полиглутамин, длина которого возрастала в белке AR от *H. sapiens* до *C. familiaris* (таблица 21). Таким образом, у большинства видов общая длина олигопептидов, кодируемых первым и третьим сайтами связывания, была близкой: у *H. sapiens* было 28 остатков глутамина, у *P. troglodytes* 27 остатков глутамина, у *C. familiaris* 34 остатка глутамина, у *R. norvegicus* 26 остатков глутамина.

Таблица 21 - Вариабельность аминокислот в участках белка AR, содержащего олигопептиды кодируемые третьим полисайтом связывающим miR-1322 [275, с. 30-41].

Аминокислоты участка белка AR	Объекты
1	2
EASTMQLLQQQQQ.....EAVSEGSSS	*Hsa*
EASTMQLLQQQQQ.....EAVSEGSSS	*Ptr*

Продолжение таблицы 21

1	2
EASTMQLL**QQQQQ**.....EAVSEGSSS	*Ppa*
EASTMQLL**QQQQQ**.....EAVSEGSSS	*Bmu*
EASTMQLL**QQQQQ**.....EAVSEGSSS	*Mml*
EASTMQLL**QQQQQ**.....EAVSKGSSS	*Cja*
EAGTMQLL**QQQQQQ**.....EVVLEGSSS	*Ame*
EAGTMQLL**QQQQQQQQQ**.....EAVSEGSSS	*Bac*
EAGTMQLL**QQQQQQQQQQ**.....EAVSEGNSS	*Ssc*
EAGTMQLLHH**QQQQQQQQQ**.....EAVSEGSNS	*Laf*
EAGTMQLL**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ**....EVVSEGGSS	*Fca*
EAGTMQLL**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ**..EVISEGSSS	*Rno*
EAGTMQLL**QQQ**R**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ**EVVSEGSSS	*Cfa*

Была замечена высокая гомология олигопептидов, которые фланкировали полиглутамин, что в сравнении с вариабельностью длины сайтов связывания miR-1322, подчеркивает значение этих олигопептидов в функции белка.

Другим геном мишенью был выбран ген *ARID3B*. В CDS mRNA гена *H. sapiens* имелось пять последовательных сайтов связывания miR-1322 (таблица 18). Начало этих сайтов связывания расположены через три нуклеотида и кодировали полиглутамин, содержащий 11 остатков Q (таблица 22). Полиглутамин начинался с пятой аминокислоты белка ARID3B, и тетрапептид MEPL расположен на N-конце полиглутамина, а на C-конце - олигопептид KQPHL. Белок ARID3B у *C. japonica* содержал аминокислотный сегмент: MEPLQQQQQQQQQQQQKQPHL. В белке ARID3B *S. boliviensis* имелось 13 глутаминов, также расположенных между олигопептидами MEPL и KQPHL. mRNA гена *ARID3B G. gorilla, C. sabaeus, P. abelii, R. roxellana* и *P. paniscus* содержала большее количество сайтов связывания miR-1322, которые кодируют полиглутамин, содержащий 14, 15, 17, 19 и 20 Q остатков, соответственно. В mRNA гена *ARID3B* у *M. fascicularis* и *M. mulatta* было 17 сайтов связывания, которые кодировали олигопептид из 23 остатков Q. mRNA гена *ARID3B P. troglodytes* содержала 21 сайтов связывания с miR-1322, а белок содержал 27 Q остатков. Во всех случаях полиглутамин находился между MEPL и KQPHL.

Таблица 22 - Вариабельность аминокислот в участках белка ARID3B, содержащего олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322 [275, с. 30-41].

Аминокислоты участка белка ARID3B	Объекты
1	2
MEPL**QQQQQQQQQQQQQQQ**R**QQQQQQQQQQQ**KQPHLAPLQM	*Ptr*
MEPL**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ**....KQPHLAPLQM	*Mml*
MEPL**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ**....KQPHLAPLQM	*Mfa*
MEPL**QQQQQQQQ**R**QQQQQQQQQQQ**.....KQPHLAPLQM	*Ppa*

Продолжение таблицы 22

1	2
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Rro*
MEPLQQQQQQQQKRQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Pab*
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Csa*
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Ggo*
MEPLQKQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Sbo*
MEPLQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Hsa*
MEPLQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	*Cja*

Характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA ортологичных генов *NCOA3* содержали от десяти до пятнадцати сайтов связывания и были одинаковы не только в mRNA гена *NCOA3* человека, но и в mRNA ортологичных генов животных, что демонстрирует близкий нуклеотидный состав полисайтов [279, с. 83-84]. Несмотря на десятки миллионов лет дивергенции изученных видов млекопитающих на фланкирующем С-конце был абсолютно консервативный декапептид TQAFSPPPNV. У всех видов, за исключением *S. boliviensis* декапептид FRQQRVAMMM был также консервативным (таблица 23).

Таблица 23 - Вариабельность аминокислот в участках белка NCOA3, содержащего олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322 [275, с. 30-41].

Аминокислоты участка белка NCOA3	Объекты
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQTQAFSPPPNV	*Hsa*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.TQAFSPPPNV	*Ptr*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ..TQAFSPPPNV	*Mfa*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ..TQAFSPPPNV	*Mml*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ....TQAFSPPPNV	*Csa*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ....TQAFSPPPNV	*Ppa*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ....TQAFSPPPNV	*Rro*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Ggo*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Cja*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Pab*
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Nle*
FRQQRMAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Pal*
FRQQRVAAMMMQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Mbr*
RPMMQPQVSSQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	*Sbo*

Величина ΔG/ΔGm в нескольких сайтах взаимодействия mir-1322 с mRNA гена *NCOR2* составляла 90%, характеристики их взаимодействия были близки, несмотря на то, что у изученных видов кодировался полиглутамин вариабельной длины [279, с. 83-84]. Олигопептид с С-конца отличался вариабельностью, за счет разного числа пролина, декапептид RRSYRRRGKG на N-конце полиглутамина был абсолютно консервативным (таблица 24).

Таблица 24 - Вариабельность аминокислот в участках белка NCOR2, содержащего олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322 [275, с. 30-41].

Аминокислоты участка белка NCOR2	Объекты
RRSYRRRGKG**QQQQQQQQQQQQQQQQQQ**MPRSGQEED	*Lve*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQQQQ**MARSSQEDK	*Nga*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQQQQ**MARSSQEDK	*Ame*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQQQQ**MPRSSQEEK	*Cfa*
RRSYRRRGKG**QQQQQQQQQQQQQQQQQQ**.MARSSQEEK	*Cgr*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQQQQ**PMPRSSQEEK	*Hsa*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQ**...MPRSNQEEK	*Ssc*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQ**..PPMPRSSQEEK	*Ptr*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQ**...PMPRSSQEEK	*Rro*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQQ**....MPRSNQEEK	*Fca*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQ**...PPMPRSSQEEK	*Ppa*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQQ**....PMPRSSQEEK	*Csa*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQ**.....MPRSSQEEK	*Chi*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQQ**.....MPRNSQEEK	*Ocu*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQQ**.PPPPPPMPRSSQEEK	*Sbo*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQQ**.......PMPRSSQEEK	*Mfa*
RRSYRRRGKS**QQQQQQQQQQ**.......PMPRSSQEEK	*Mml*
RRSYRRRGKS**QQQQQQ**.........PPPMPRSSQEEK	*Cja*
RRSYRRRGKS**QQQ**...........PPPPPRSSQEEK	*Hgl*

Были определены сайты связывания miR-1322 в mRNA гена *SMARCA2* для человека и 15 животных, они кодировали полиглутамин (таблица 25). Полиглутамин фланкирован полипептидом VQGKRTLPGM, расположенным на N-конце полиглутамина, а на С-конце располагался пентапептид PALVN. Белок SMARCA2 *M. fascicularis* содержит сегмент аминокислот: QPLPETLQLAVQGKRTLPGMQQQQQQQQPQQQQQQQQPQQQPPQPQTQQ QQQPALVN. В mRNA *C. sabaeus* имеется 24 остатка Q, также расположеных между полипептидами VQGKRTLPGM и PALVNYNRPS. mRNA гена *SMARCA2* таких видов, как *M. mulatta, P. troglodytes, N. leucogenys, C. jacchus* содержало также большое количество сайтов связывания с miR-1322, которые кодировали полиглутамины, содержащие 28, 26, 26, 34 остатков Q, соответственно.

Таблица 25 - Вариабельность аминокислот в участках белка SMARCA2 содержащего олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322 [275, с. 30-41].

Аминокислоты участка белка SMARCA2	Объекты
1	2
PGM**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQATPQX**PVLVN	*Hgl*
PGM**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQQPQQQAQAQPQQQQQQQQQQ**PALVS	*Mmu*

Продолжение таблицы 25

1	2
PGI**QQQQQQQQQQQQQQQQQQPQQPQQPQQQTQAQPQQQQQQQQQP**....PTLVS	*Rno*
PGM**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAPRPQPQQQQ**.....PALVS	*Tch*
PGL**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQQQPPQPQTQQQQQ**.........PALVN	*Hsa*
PGM**QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPQPQTQQQQ**.........PALVN	*Cja*
PGM**QQQQQQQQQPQQQQQQQQQPQQQPPQPQTQQQQQ**.............PALVN	*Mfa*
PGM**QQQQQQQQQPQQQQQQQQQPQQQPPQPQTQQQQQ**.............PALVN	*Mml*
PGM**QQQQQQQQPPPQQQQQQPPQQQPPQPQTQQQQQ**.............PALVN	*Csa*
PGM**QQQQQQPQQQQQQPQQPQQPQQQQPQTQQQQQ**.............PALVN	*Nle*
PGM**QQQQQQQQQQQQQQQQQPQQQPPQPQTQQQQQ**.............PALVN	*Ptr*
PGM**QQQQPQHQQPPQPQPQAQQPQQQ**.......................ALVN	*Cfa*
PGM**QQQQPQPQPQPPQPQPQPQPQQ**.......................PALVN	*Laf*
PGM**QQQPPPQPQPQPQPQQPQPQQQ**.......................ALVN	*Bta*
PGM**QQQPPPQPQPQPQPQQPQPQQQ**.......................ALVN	*Pho*
PGM**QQQPPPQPQPQPQPQQPQPQQQ**.......................ALVN	*Chi*
*Примечание. **X** = **PQPQPQPQQQ**	

Во всех случаях полиглутамин находился между фланкирующими VQGKRTLPGM и PALVN. Таким образом, наличие в белке полиглутамина может свидетельствовать о том, что кодирующий его участок mRNA, является сайтом связывания miR-1322.

3.5 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа HER2

3.5.1 Характеристики сайтов связывания miRNA из miRBase с mRNA кандидатных генов субтипа HER2

Двенадцать кандидатных генов субтипа HER2 рака молочной железы служили мишенями miRNA (таблица 26). mRNA гена *ADAM17* полностью комплементарно связывает miR-619-5p. Учитывая величину свободной энергии связывания, равную -121 кДж/моль, ассоциация miR-619-5p с *ADAM17* является хорошим маркером заболевания. miR-619-5p, в сочетании с генами *AURKA* и *BRCA2,* на таких же основаниях могут служить маркерами субтипа HER2.

Таблица 26 - Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа HER2 [280].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
ADAM17	miR-619-5p	3466	-121	100	22
ADAM17	miR-1285-5p	3524	-104	92	21
AURKA	miR-5095	420**	-108	93	21
AURKA	miR-619-5p	426**	-119	98	22
BRCA2	miR-619-5p	10746	-117	96	22

Продолжение таблицы 26

1	2	3	4	5	6
BRIP1	miR-1273a	4222	-113	85	25
BRIP1	miR-1273g-3p	4244	-110	95	21
BRIP1	miR-5095	6581	-115	98	21
BRIP1	miR-619-5p	6587	-119	98	22
BRIP1	miR-5585-3p	6728	-113	96	22
BRIP1	miR-1285-5p	6827	-104	92	21
BRIP1	miR-1972	7273	-117	95	22
CDK6	miR-548h-3p	1677	-104	91	23
CDK6	miR-548z	1677	-104	91	23
CDK6	miR-548aq-3p	1678	-102	94	22
CDK6	miR-548az-3p	1678	-98	94	21
CDK6	miR-466	1892 ÷ 1926	-100	85	23
CDK6	miR-466	1908	-108	93	23
CDK6	miR-466	1920	-108	93	23
EPOR	miR-328-5p	1461*	-121	88	23
ERBB3	miR-619-5p	4950	-117	96	22
ERBB3	miR-619-5p	5104	-121	100	22
H2AFX	miR-328-5p	672	-119	86	23
MAPK3	miR-1181	114*	-115	90	21
MAPK3	miR-6884-3p	175*	-113	88	23
MAPK3	miR-6805-3p	1145*	-117	87	23
MAPK3	miR-6887-5p	1528	-113	88	23
MAZ	miR-1470	19**	-123	97	21
MAZ	miR-6850-5p	92**	-115	87	22
MAZ	miR-4466	107**	-110	98	18
MAZ	miR-762	111**	-123	91	22
MAZ	miR-6729-5p	361*	-115	87	22
MAZ	miR-2861	376*	-110	95	19
MAZ	miR-762	499*	-117	86	22
MAZ	miR-3960	505*	-119	95	20
MAZ	miR-4706	605*	-123	87	25
MAZ	miR-3960	614*	-117	93	20
MAZ	miR-1247-3p	664*	-119	86	24
MAZ	miR-1343-5p	1609	-115	86	22
MAZ	miR-6805-3p	2552	-115	86	23
NISCH	miR-762	3282*	-117	86	22
NISCH	miR-6756-5p	3419*	-115	86	23
TIMP3	miR-4449	1072*	-115	87	22
TIMP3	miR-197-5p	1838	-115	87	23
TIMP3	miR-1224-5p	3268	-104	96	19
*Примечание. Без * - 3'UTR, * - CDS, ** - 5'UTR. ÷ - изменение параметра в интервале.					

mRNA гена *BRIP1* может связывается с уникальными miRNA группы miR-1285-5p, miR-5095, 619-5p, miR-5585-3p и семейства miR-1273a, miR-1273g-3p. Эти miRNA, с высоким уровнем комплементарности связываются с

mRNA гена *BRIP1* (величина ΔG/ΔGm достигала 98%) и с высокой свободной энергией взаимодействия, поэтому они могут быть использованы в качестве маркеров для разработки методов ранней диагностики субтипа HER2 рака молочной железы.

mRNA гена *CDK6* имеет сайты связывания для miRNA семейства miR-548 и множественные сайты связывания для miR-466. Наличие в mRNA гена *CDK6* множественных сайтов связывания в несколько раз увеличивает вероятность ее взаимодействия с этими miRNA.

Ключевым представителем кандидатных генов субтипа HER2 является ген *ERBB3*. Два сайта связывания в mRNA гена *ERBB3* для уникальной miR-619-5p с высокой комплементарностью и высокой свободной энергией являются основанием предлагать эту ассоциацию в качестве маркера для идентификации развития субтипа HER2 (таблица 26).

Четыре miRNA, связывающиеся с mRNA гена *MAPK3*, могут сильно влиять на его экспрессию. Сайты связывания трех miRNA расположены в CDS, что свидетельствует о раннем их возникновении.

С mRNA гена *MAZ* могут связываться 12 miRNA, сайты связывания, которых расположены в 5'UTR и CDS, с величиной ΔG равной от -110 кДж/моль до -123 кДж/моль, и величиной ΔG/ΔGm от 86% до 97%. Поскольку miR-1470, miR-762 и miR-4706 связываются с mRNA гена *MAZ* с величиной -123 кДж/моль, то эти miRNA в первую очередь необходимо использовать в качестве маркеров для диагностики субтипа HER2. Несколько последовательно расположенных сайтов связывания miR-3960 кодируют олигопептид поли-Ala. Такое число сайтов связывания miR-3960 значительно повышает эффективность контроля экспрессии гена *MAZ* этой miRNA. MAZ является Myc ассоциированным транскрипционным фактором и поэтому может влиять на транскрипцию нескольких генов, участвующих в онкогенезе.

mRNA гена *NISCH* может связывать две miRNA с величиной ΔG изменяющейся от -115 кДж/моль до -117 кДж/моль. Что является основанием включить ген *NISCH* с miR-762 и miR-6756-5p в качестве маркеров для субтипа HER2.

mRNA гена *TIMP3* имеет три сайта связывания для трех miRNA, что дает основание контролировать уровень этих miRNA в процессе развития субтипа HER2.

В таблице 27 приведены примеры взаимодействия некоторых miRNA с mRNA их генов мишеней, которые могут быть использованы качестве ассоциаций для разработки методов диагностики субтипа HER2 рака молочной железы.

Приведенные данные демонстрируют важную роль неканонических пар нуклеотидов при взаимодействии miRNA с mRNA кандидатных генов, участвующих в развитии субтипа HER2 рака молочной железы. Например, при взаимодействии miR-548av с mRNA гена *CDK6* образуются по три неканонические пары A-C и две пары G-U. При связывании miR-877-3p с mRNA гена *MAZ* две пары A-C и две пары G-U.

Таблица 27 - Схемы и характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа HER2 рака молочной железы [280, с. 52-66].

ERBB3;miR-619-5p;3'UTR;4950;-117;96 5'-GGCUCAUGCCUGUAAUC**U**CAGC-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAG**G**GUCG-5'	*MAZ*;miR-3960;CDS;614;-117;93 5'-CCCCCGCCUCCGCCGCC**A**C**U**-3' 3'-GGGGGCGGAGGCGGCGG**C**G**G**-5'
ADAM17; miR-619-5p;3'UTR;3466;-121;100 5'-C**C**CAGGCUGGAGUGCAGUGGU-3' 3'-G**A**GUCCGACCUCACGUCACCA-5'	*AURKA*;miR-619-5p;5UTR;426;-119;98 5'-GGCUCAUGCC**C**GUAAUCCCAGC-3' 3'-CCGAGUACGG**A**CAUUAGGGUCG-5'
BRIP1;miR-5095;3'UTR;6851;-115;98 5'-CGCGGUGG**C**UCACGCCUGUAA-3' 3'-GCGCCACC**A**AGUGCGGACAUU-5'	*BRIP1*;miR-1273g-3p;3'UTR;4244;-110;95 5'-C**C**CAGGCUGGA**A**UGCAGUGGU-3' 3'-G**A**GUCCGACCU**C**ACGUCACCA-5'
ERBB3;miR-619-5p;3'UTR;5104;-121;100 5'-GGCUCAUGCCUGUAAUCCCAGC-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG-5'	*AURKA*;miR-5095;5UTR;420;-108; 93 5'-CGCGGUGG**C**UCA**U**GCC**C**GUAA-3' 3'-GCGCCACC**A**AGU**G**CGG**A**CAUU-5'
BRCA2;miR-619-5p;3'UTR;10746;-117;96 5'-GGCUCAUGCCUGUAAUCCCA**A**C-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAGGGU**C**G-5'	*BRIP1*;miR-5585-3p;3'UTR;6728;-113;96 5'-**G**CCUGUAGUCCCAGCUA**C**UCAG-3' 3'-**U**GGACAUCAGGGUCGAU**A**AGUC-5'
CDK6;miR-548av;3'UTR;1677;-98;85 5'-UGCAAGAGU**G**AU**U**GC**A**G**C**UUU**A**-3' 3'-ACGUUCUCA**U**UA**G**CG**C**C**A**AAA**C**-5'	*MAZ*;miR-877-3p;3'UTR;2273;-106;91 5'-C**CA**GG**G**GGAGGGAG**G**AGAGGA-3' 3'-G**AC**CC**U**CCUCCCUC**U**UCUCCU-5'
*Примечание. Название гена; miRNA; участок mRNA; начало сайта связывания miRNA, нт; величина ΔG, кДж/моль; величина ΔG/ΔGm, %. Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

3.5.2 Характеристики сайтов связывания miRNA (Londin et al.) с mRNA кандидатных генов субтипа HER2

Из 12 генов мишеней miRNA в 5'UTR их mRNA связывалось 23 miRNA (таблица 28). mRNA генов *ADAM10, MAZ, NISCH* содержали по два сайта связывания miRNA, нуклеотидные последовательности, которых частично совпадали.

Три сайта связывания miR-19-39380-3p, miR-19-42218-3p, miR-19-41131-3p составляли кластер длиной 26 нт расположенный с 77 нт по 103 нт в 5'UTR mRNA гена *EPOR*. Без наложения сайтов их длины равнялась бы 67 нт, что составляет половину участка 5'UTR равного 135 нт. Следовательно, компактизация сайтов связывания miRNA имеет смысл для сокращения доли сайтов связывания в 5'UTR mRNA гена *EPOR*.

В mRNA гена *MAZ* сайты связывания miR-15-39164-3p, miR-18-41189-3p, miR-11-29998-3p располагались в кластере с 16 нт по 50 нт длиной 34 нт. Общая длина трех miRNA составляет 66 нт, что занимало бы существенную часть 5'UTR равного 168 нт.

Таблица 28 - Характеристики взаимодействия miRNA в 5'UTR mRNA субтипа HER2 [281].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
ADAM10	miR-19-43936-3p	134	-108	93	22
	miR-9-26506-3p	165	-117	95	22
	miR-5-15733-3p	416	-132	89	24
	miR-1-2047-5p	420	-113	90	22
BRCA2	miR-19-42224-5p	25	-115	93	21
BRIP1	miR-18-39953-5p	7	-129	90	23
CDK6	miR-17-21769-5p	261	-106	91	21
EPOR	miR-19-39380-3p	77	-108	91	21
	miR-19-42218-3p	79	-119	89	23
	miR-19-41131-3p	80	-129	90	23
EPO	miR-12-31979-3p	12	-121	89	23
ERBB3	miR-1-163-3p	114	-113	93	21
MAPK3	miR-17-36936-3p	84	-113	90	22
MAZ	miR-15-39164-3p	16	-117	93	20
	miR-18-41189-3p	16	-134	91	23
	miR-11-29998-3p	27	-127	91	23
	miR-14-31624-3p	112	-127	88	24
	miR-7-12728-5p	114	-121	92	22
NISCH	miR-X-48174-3p	31	-125	88	24
	miR-19-43644-3p	38	-123	89	23
	miR-8-21978-5p	41	-125	88	24
RAD21	miR-1-3919-5p	180	-121	88	24
TIMP3	miR-6-17519-3p	1102	-121	90	22

*Примечание. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера.

В mRNA гена *MAZ* сайты связывания miR-15-39164-3p, miR-18-41189-3p, miR-11-29998-3p располагались в кластере с 16 нт по 50 нт длиной 34 нт. Общая длина трех miRNA составляет 66 нт, что занимало бы существенную часть 5'UTR равного 168 нт.

Средняя величина свободной энергии связывания miRNA с mRNA по участку 5'UTR всех mRNA составляет -120,2 кДж/моль. Поэтому число ассоциаций miRNA с mRNA, имеющих свободную энергию взаимодействия более -120 кДж/моль равно 13. Все они могут служить в качестве маркеров при разработке методов ранней диагностики субтипа HER2.

mRNA восьми генов были мишенью 26 miRNA (таблица 29). mRNA генов *MAPK3* и *NISCH* имели по два сайта связывания miRNA с наложением нуклеотидных последовательностей.

Ген *MAZ* был мишенью для 15 miRNA, сайты связывания, которых располагались в четыре кластера. Первый кластер включал сайты связывания miR-5-17008-3p и miR-4-12861-5p. Второй кластер длиной 74 нт был локализован с 457 нт по 530 нт. Общая длина всех сайтов связывания miRNA этого кластера равнялась 260 нт, что требует их компактизации, поскольку,

как правило, в CDS все нуклеотиды участвуют в кодировании функционально важных аминокислот. Третий кластер состоял из сайтов связывания miR-19-33623-3p, miR-19-41914-3p, длиной 24 нт. Четвертый кластер включал сайты связывания трех miRNA с 893 нт по 923 нт длиной 31 нт. Все сайты связывания miRNA, взаимодействующих с mRNA гена имеют общую длину 440 нт, что составляет около 30% всей длины CDS. Кластеризованные сайты связывания miRNA занимают только 12% длины CDS. Ген *MAZ* является наиболее уязвимой мишенью для miRNA, поэтому его экспрессия должна контролироваться в приоритетном порядке.

Таблица 29 - Характеристики взаимодействия miRNA в CDS mRNA субтипа HER2 [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
CDK2	miR-1-83-3p	906	-110	90	22
EPO	miR-3-8171-3p	741	-110	93	22
FKBPL	miR-3-4734-5p	769	-115	89	23
MAPK3	miR-1-2802-3p	1144	-117	93	22
	miR-19-42375-3p	1144	-110	91	21
MAZ	miR-5-17008-3p	363	-125	89	23
	miR-4-12861-5p	372	-119	92	22
	miR-3-8100-5p (3)	457 ÷ 469	-134 ÷ -138	91 ÷ 94	24
	miR-7-16350-5p	459	-119	93	21
	miR-2-6809-5p	461	-125	87	25
	miR-2-3313-3p (2)	464 ÷ 467	-140	88	25
	miR-20-43381-5p	489	-121	92	21
	miR-4-11923-3p	489	-125	94	22
	mir-1-2121-3p	500	-138	88	25
	miR-19-33623-3p	506	-132	89	24
	miR-19-33623-3p	608	-134	90	24
	miR-19-41914-3p	608	-117	92	21
	miR-3-7886-3p	671	-129	90	24
	miR-19-43065-3p	893	-113	90	22
	miR-2-7331-5p	900	-123	89	23
	miR-13-35476-3p	901	-125	97	22
NISCH	miR-3-7979-3p	1474	-93	92	21
	miR-12-32603-3p	2045	-117	93	23
	miR-9-26506-3p	2055	-113	91	22
	miR-17-36936-3p	2120	-115	92	22
PARP1	miR-19-36095-3p	1275	-119	90	23
TNF	miR-20-42898-3p	230	-121	92	23

*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Средняя величина свободной энергии связывания miRNA в CDS mRNA всех генов мишеней равнялась -123,6 кДж/моль. Из 26 miRNA 13 miRNA

имели свободную энергию взаимодействия более -120 кДж/моль, что дает основание использовать их ассоциации с соответствующими генами мишенями в качестве маркеров развития субтипа HER2.

В 3UTR mRNA генов *BRCA2, H2AFX* был*о* выявлено по два сайта связывания miRNA с наложением нуклеотидных последовательностей (таблица 30).

Ген *CDK6* был мишенью для шести miRNA. Девять сайтов связывания miR-10-29282-3p, семь сайтов связывания miR-15-36862-3p и один сайт связывания miR-4-13015-5p образовали кластер с 1896 нт по 1943 нт длиной 47 нт.

Таблица 30 - Характеристики связывания miRNA в 3'UTR mRNA субтипа HER2 [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
ADAM17	miR-7-20036-5p	3449	-113	93	22
BRCA2	miR-1-356-5p	10722	-102	91	21
	miR-5-18072-3p	10738	-104	92	22
	miR-22-45335-5p	10821	-113	90	23
BRIP1	miR-6-19858-3p	4481	-110	93	22
	miR-1-735-3p	6417	-102	92	22
	miR-X-45975-5p	6689	-96	92	22
	miR-2-4826-5p	6811	-113	90	23
CDK6	miR-9-24961-3p	1678	-98	90	22
	miR-10-29282-3p (9)	1896 ÷ 1920	-104 ÷ -106	89 ÷ 91	23
	miR-15-36862-3p (7)	1900 ÷ 1918	-108 ÷ -115	89 ÷ 95	23
	miR-4-13015-5p	1901	-102	91	22
	miR-9-9900-3p	3041	-102	94	20
	miR-8-23986-3p	7773	-127	88	24
H2AFX	miR-20-45152-5p	506	-136	91	24
	miR-1-3919-5p	632	-123	89	24
	miR-16-33136-3p	827	-123	91	22
	miR-17-37169-3p	834	-110	96	18
	miR-7-20437-5p	970	-115	89	23
LIN28B	miR-19-38260-3p	3909	-113	90	22
MAPK3	miR-5-14412-5p	1789	-115	90	23
MAZ	miR-X-48174-3p	2072	-127	90	24

*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Общая длина всех 17 сайтов связывания равнялась 390 нт, что составляет 3,8% от общей длины 3UTR mRNA гена *CDK6* равной 10219 нт. Компактизацию сайтов связывания miRNA трудно объяснить только экономией длины 3’UTR. По-видимому, имеются другие причины компактизации сайтов связывания. Например, связывание одного комплекса RISC с miRNA не позволяет другим miRNA связываться со своим сайтом и,

если эта miRNA является сигналом хозяйского гена, то геном *CDK6* не воспринимается этот сигнал. То есть возникает конкуренция разных miRNA за сайт связывания и за возможность регулировать экспрессию гена мишени.

Средняя величина свободной энергии взаимодействия всех miRNA с mRNA в 3'UTR составляла -110,4 кДж/моль. Из 22 miRNA пять miRNA связывались с mRNA соответствующих генов мишеней со свободной энергией взаимодействия более -120 кДж/моль (таблица 30). Ассоциации этих miRNA с их генами мишенями рекомендуются использовать в качестве маркеров для диагностики субтипа HER2.

miR-10-29282-3p и miR-15-36862-3p, имеющие соответственно девять и семь сайтов связывания в mRNA гена мишени *CDK6*, рекомендуется использовать в качестве маркеров для ранней диагностики, в связи с тем, что увеличение числа сайтов связывания miRNA способствует увеличению вероятности их обнаружения. Только miR-20-45152-5p взаимодействовала с mRNA гена *H2AFX* с величиной свободной энергии связывания более -130 кДж/моль.

В таблице 31 приведены схемы взаимодействия некоторых miRNA с различными регионами mRNA (5'UTR, CDS, 3'UTR) кандидатных генов субтипа HER2 рака молочной железы. Схемы взаимодействия miRNA с mRNA отчетливо показывают роль неканонических пар A-C и G-U в увеличении свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA.

Таблица 31 - Схемы сайтов связывания miRNA с кандидатными генами РМЖ субтипа HER2 [281, с. 30-48].

BRCA2;miR-5-18072-3p;3'UTR;10738;
-104;92
5'-A**G**CUC**G**GUGGCUCAU**G**CCU**G**UA-3'
  |||||||||||||||||||
3'-U**U**GAG**U**CACCGAGUA**U**GGA**U**AU-5'
	BRCA2;miR-1-356-5p;3'UTR;10723;
	-102;91
	5'-AAACAU**C**UUUGGC**U**G**A**GCUCG-3'
	  |||||||||||||||||||
	3'-UUUGUA**A**AAACCG**G**C**C**CGAGC-5'

CDK6;miR-10-29282-3p;3'UTR;1920;
-106;91
5'-GUGUGUG**U**GU**G**U**G**UGUGUGUA-3'
  |||||||||||||||||||
3'-CACACAC**G**CA**U**A**U**A**U**ACACACAU-5'
	CDK6;miR-17-21769-5p;5'UTR;261;
	-106;91
	5'-G**G**C**G**GC**G**GCGGC**G**GC**G**ACUCU-3'
	  |||||||||||||||||||
	3'-C**U**G**U**CG**U**CGCCG**U**CG**U**UGAGA-5'

ERBB3;miR-1-163-3p;5'UTR;115;-110;91
5'-C**C**C**G**G**A**CUCCGGCUCCG**G**CUC-3'
  |||||||||||||||||||
3'-G**A**G**U**C**C**GAGGCCGAGGC**U**GAG-5'
	MAZ;miR-7-12728-5p;5'UTR;114;-121;92
	5'-CG**G**CC**C**GCGCCCCC**G**GCCCCCG-3'
	  |||||||||||||||||||
	3'-GC**U**GG**A**CGCGGGGG**U**CGGGGGA-5'

EPOR;miR-5-16562-3p;CDS;173;-119;88
5'-GCUCCCU**U**UGUCUCCUGCUCGCUG-3'
  |||||||| ||||||||| ||||
3'-CGAGGGA**G**AGAGAGGACGACCGAC-5'
	MAZ;miR-1-2121-3p;CDS;615;-134;85
	5'-CG**G**CC**C**GCGCCCCC**G**GCCCCCG-3'
	  |||||||||||||||||||
	3'-GC**U**GG**A**CGCGGGGG**U**CGGGGGA-5'

*Примечание: Ген; miRNA; начало сайта связывания; участок miRNA; свободная энергия связывания (ΔG, кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

3.6 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B

3.6.1 Характеристики сайтов связывания miRNA из miRBase с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B

Мишенями для miRNA были десять кандидатных генов субтипов luminal A и B рака молочной железы. С mRNA гена *HMGA2* связывались пять miRNA, с mRNA гена *MAPT* - шесть miRNA, с mRNA гена *SMAD3* - четыре miRNA, с mRNA гена *TGFB1* имели сайты связывания шесть miRNA (таблица 32).

Таблица 32 - Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B [280, с. 52-66].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
EZH1	miR-6127	2497	-102	94	19
FOXA1	miR-3960	120**	-115	92	20
FOXA1	miR-6848-5p	1287*	-115	87	23
GTF2IRD1	miR-4734	138**	-115	87	22
GTF2IRD1	miR-6729-5p	245**	-115	87	22
HMGA2	miR-6894-5p	189**	-115	86	24
HMGA2	miR-3960	512**	-108	86	20
HMGA2	miR-6756-5p	529**	-117	87	23
HMGA2	miR-3960	549**	-117	93	20
HMGA2	miR-4739	573**	-123	85	25
ITGB1	miR-4787-5p	92*	-123	92	22
MAPT	miR-4665-5p	112**	-117	86	23
MAPT	miR-7106-5p	1008*	-106	94	20
MAPT	miR-5088-5p	1586*	-115	86	24
MAPT	miR-762	2725	-119	87	22
MAPT	miR-6756-3p	3207	-98	85	20
MAPT	miR-650	3495	-110	93	21
MCM7	miR-4433b-5p	248**	-100	85	21
MCM7	miR-670-3p	2679	-89	86	21
SMAD3	miR-6848-5p	138	-115	87	23
SMAD3	miR-4690-5p	2066	-115	92	22
SMAD3	miR-3620-5p	2069	-117	89	22
SMAD3	miR-6089	2073	-132	89	24
SMAD3	miR-3620-5p	2074	-115	87	22
SMAD3	miR-6089	2078	-136	91	24
SOX4	miR-935	1303*	-115	89	23
SOX4	miR-6765-5p	1924*	-125	87	25
TGFB1	miR-4787-5p	205**	-117	87	22
TGFB1	miR-877-3p	233**	-108	93	21
TGFB1	miR-4632-5p	871**	-115	86	23
TGFB1	miR-6089	2060	-132	89	24
TGFB1	miR-6089	2065	-136	91	24
TGFB1	miR-3620-5p	2086	-115	87	22

Продолжение таблицы 32

1	2	3	4	5	6
TGFB1	miR-6089	2089	-127	86	24
TGFB1	miR-6089	2095	-127	86	24
*Примечание. Без звездочки - 3'UTR, * - CDS, ** - 5'UTR.					

Следовательно, эти гены в сильной степени зависят от miRNA. mRNA гена *TGFB1* имела четыре сайта связывания для miR-6089, а mRNA гена *SMAD3* два сайта связывания для miR-6089 с величиной ΔG -132 кДж/моль и -136 кДж/моль. Такие большие величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA очень редкие для сайтов связывания расположенных в 3'UTR, что обусловливает их высокую функциональную значимость.

Особенностью кандидатных генов субтипов luminal A и B, является отсутствие в их mRNA сайтов связывания уникальных miRNA семейства miR-1273 и группы miR-5095, miR-619-5p, miR-5585-3p, miR-5096, miR-1285-5p. Эта особенность будет учитываться при анализе экспрессии miRNA при субтипах luminal A и B.

Результаты взаимодействия некоторых miRNA с mRNA кандидатных генов приведены в таблице 33.

Таблица 33 - Схемы и характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B рака молочной железы [280, с. 52-66].

HMGA2; miR-3960; 5'UTR;512; -108; 86
5'-CC**U**CC**A**CCUCC**A**CCGCC**A**CC-3'
  |||||||||||||||||||
3'-GG**G**GG**C**GGAGG**C**GGCGG**C**GG-5'
	MAPT; miR-6756-3p; 3'UTR;3207; -98; 85
	5'-CUGGGCAG**A**G**G**GGA**GA**GG**A**A-3'
	  |||||||||||||||||||
	3'-GACCCGUC**C**C**U**CCU**UC**CC**C**U-5'

MCM7; miR-4433b-5p; 5'UTR;248; -100; 85
5'-**G**C**G**GGAG**C**GGGGGGUGGG**GUGC**-3'
  ||||||||||||||||||||
3'-**U**G**U**CCUC**A**CCCCCACCC**UGUA**-5'
	MCM7; miR-670-3p; CDS;2769;-89; 86
	5'-**CU**CUG**G**AUGAAUAUGAGGA**G**C-3'
	  ||||||||||||||||||
	3'-**AG**GAC**U**UACUUAUACUCCU**U**U-5'

EZNH; miR-4290; 3'UTR;3705; -89; 86
5'-G**G**GGGAAGAA**GA**GAGGG**UG**-3'
  |**|**||||||||**||**|||||||
3'-C**U**CCCUUCUU**UC**CUCCC**GU**-5'
	GTF21RD1; miR-4271; 5'UTR; 268; -91; 86
	5'-C**U**C**UG**CCU**C**U**C**CUUCCCCC-3'
	  |**||||||||||||||||**
	3'-G**GG**G**U**GGA**AA**GAAGGGGG-5'

HMGA2; miR-329-5p; 5'UTR; 11; -102; 86
5'-G**GGG**CAG**G**AAC**U**CAGAAAACUUC-3'
  |**|||**||||||||||||||||
3'-C**UUU**GUC**U**UUG**G**GUCUUUUGGAG-5'
	SMAD3; miR-7977; 3'UTR; 2601; -85; 85
	5'-UGG**CA**C**A**UUG**A**CUGGGAA-3'
	  |||**|||**|||||||||
	3'-ACC**AC**G**C**AAC**C**GACCCUU-5'

*Примечание: Ген; miRNA; начало сайта связывания; участок miRNA; свободная энергия связывания (ΔG, кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

Следует отметить, что даже при величине ΔG/ΔGm равной 86% наблюдается сохранение структуры двухцепочечной RNA, несмотря на наличие одной пары A-C и трех пар G-U при взаимодействии miR-670-3p с

mRNA гена *MCM7*. При связывании miR-4433b-5p с mRNA гена *MCM7* образуются две пары A-C и три пары G-U. Приведенные в таблице 33 схемы свидетельствуют об участии всех нуклеотидов miRNA в связывании с mRNA.

3.6.2 Характеристики сайтов связывания miRNA (Londin et al.) с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B

В 5'UTR mRNA гена *FOXA1* выявлено 20 сайтов связывания miRNA с наложением нуклеотидных последовательностей (таблица 34). Все 18 miRNA образовывали кластер с 99 нт по 151 нт длиной 31 нт. Общая длина всех 20 сайтов равнялась 427 нт. Образование кластера сайтов связывания для гена *FOXA1* в 5'UTR говорит о большей способности данного гена к компактизации, что способствует возникновению конкуренции данных miRNA за сайт связывания. Средняя величина энергии связывания для 20 miRNA равнялась -116,8 кДж/моль.

Таблица 34 - Характеристики связывания miRNA с 5'UTR mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
FOXA1	miR-1-1904-5p	99	-123	89	24
	miR-20-43873-3p	110	-123	89	23
	miR-1-1510-5p	111	-140	94	24
	miR-5-3563-5p	112	-127	92	22
	mir-1-2121-3p	115	-140	89	25
	miR-16-16153-5p	116	-108	100	17
	miR-1-1714-3p (2)	118 ÷ 121	-117 ÷ -121	93 ÷ 97	20
	miR-16-29933-5p	118	-108	100	17
	miR-4-9774-3p	118	-108	100	17
	miR-5-16727-5p	118	-115	92	20
	miR-17-40348-5p	120	-123	91	23
	miR-19-21199-3p	120	-140	89	25
	miR-9-28523-5p (2)	121 ÷ 122	-117	93	20
	miR-19-33623-3p	122	-134	90	24
	miR-10-13655-3p	124	-123	91	22
	miR-1-155-3p	127	-129	94	22
	miR-4-6496-3p (2)	127 ÷ 130	-119 ÷ -121	92 ÷ 93	21
GTF2IRD1	miR-14-35532-3p	206	-117	89	23
	miR-12-32997-5p	208	-125	89	23
	miR-8-23353-3p	340	-123	92	22
HMGA2	miR-2-3313-3p	99	-138	87	25
	miR-17-38391-3p	312	-115	90	23
	miR-3-9317-3p	314	-110	90	22
	miR-19-43373-3p	539	-119	93	21
	miR-15-32047-5p (2)	541 ÷ 544	-129 ÷ -134	88 ÷ 91	24
	miR-1-265-3p	542	-125	91	22
	miR-17-41168-3p	542	-117	95	20

Продолжение таблицы 34

1	2	3	4	5	6
	miR-3-9301-5p	542	-115	93	20
	mir-1-2121-3p	544	-146	93	25
	miR-19-33623-3p	544	-142	96	24
	miR-1-155-3p	550	-132	95	22
	miR-9-28523-5p	550	-115	92	20
	miR-10-26815-5p	575	-121	88	24
	miR-11-18690-5p	585	-110	90	22
	miR-1-1819-3p	788	-123	89	23
ITGA6	miR-2-4035-3p	111	-115	89	23
	miR-7-20589-3p	161	-113	91	21
JAK1	miR-11-29827-3p	66	-129	90	24
MAPT	miR-5-13986-5p	107	-113	90	22
	miR-17-40141-3p	120	-115	92	20
MCM7	miR-7-20142-5p	26	-119	89	23
	miR-8-23353-3p	111	-121	90	22
	miR-16-39014-5p	846	-106	91	21
SMAD3	miR-7-15849-3p	4	-115	100	18
	miR-4-12789-5p	31	-115	93	21
	miR-15-11315-5p	194	-117	100	19
	miR-12-29625-3p	243	-125	92	23
TGFB1	miR-20-43381-5p	1	-121	92	21
	miR-5-8853-5p	6	-115	92	20
	miR-9-13610-3p	6	-121	92	21
	miR-12-30416-5p	186	-117	92	22
	miR-10-13655-3p	209	-129	95	22
	miR-11-29785-3p	232	-108	91	21
	miR-9-26506-3p	237	-113	91	22
	miR-17-38733-3p	241	-119	89	24

*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

У гена *GTF2IRD1* имелось три сайта связывания, из них два сайта образовывали кластер с наложением нуклеотидных последовательностей. Ген *HMGA2* имел 16 сайтов связывания для 15 miRNA. miR-17-38391-3p и miR-3-9317-3p образовывали кластер с 312 нт по 214 нт, 11 miRNA имели кластер с 539 нт по 585 нт с общей длиной 268 нт.

Гены *ITGA6, MAPT* имели по два сайта связывания, ген *JAK1* имел один сайт связывания для miR-11-29827-3p. Ген *MCM7* имел три сайта связывания для разных miRNA, ген *SMAD3* четыре сайта связывания для miRNA с четвертого нт по 243 нт без наложения нуклеотидных последовательностей. Ген *TGFB1* имел восемь сайтов связывания для разных miRNA из них два кластера: для miR-20-43381-5p, miR-5-8853-5p, miR-9-13610-3p и для miR-9-26506-3p, miR-17-38733-3p, miR-11-29785-3p.

Средняя величина свободной энергии взаимодействия всех miRNA с mRNA в 5'UTR составляла -119.2±9,0 кДж/моль. Из всех miRNA 29 miRNA связывались с mRNA соответствующих генов мишеней со свободной энергией взаимодействия более -120 кДж/моль. Ассоциации этих miRNA с их генами мишенями рекомендуются использовать в качестве маркеров для диагностики субтипов luminal A и B.

В CDS mRNA генов *ANGPTL4, TNC* выявлено по два сайта связывания. miR-19-43315-5p связывалась с 100% комплементарностью и с энергией взаимодействия -134 кДж/моль (таблица 35).

Таблица 35 - Характеристика взаимодействия miRNA в CDS mRNA субтипов luminal A и B [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
ANGPTL4	miR-19-43315-5p	259	-134	100	23
	miR-9-26025-3p	567	-113	90	22
FOXA1	miR-X-44972-5p	762	-117	92	20
	miR-5-15733-3p	768	-132	89	24
	miR-9-20317-3p	1150	-134	90	24
GTF2IRD1	miR-8-21162-5p	959	-121	92	23
ITGB1	miR-10-26815-5p	61	-127	92	24
	miR-22-46979-5p	91	-127	92	23
	miR-10-13655-3p	95	-123	91	22
	miR-5-8853-5p	98	-117	93	20
	miR-16-40261-3p	101	-117	93	20
JAK1	miR-3-10699-5p	2532	-108	96	21
SOX4	miR-2-6184-3p	883	-117	90	23
	miR-4-13460-3p	1291	-123	91	22
	miR-5-14873-3p	1293	-121	90	22
	miR-6-16793-3p	1323	-113	93	20
	miR-4-11437-3p	1402	-125	89	23
	miR-X-48174-3p	1454	-125	88	24
	miR-9-28523-5p	1544	-115	92	20
	miR-12-30075-3p	1721	-127	88	24
	miR-9-27181-5p	1723	-127	92	22
	miR-8-24013-5p	1826	-113	91	21
	miR-9-13610-3p	1900	-121	92	21
TNC	miR-19-42814-5p	1199	-104	89	23
	miR-19-41413-3p	3739	-110	90	22

*Примечание. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера.

Ген *FOXA1* имел кластер сайтов связывания для двух miRNA. Гены *GTF2IRD1, JAK1* имели по одному сайту связывания для miR-8-21162-5p с энергией взаимодействия -121 кДж/моль и со степенью комплементарности равной 92% и для miR-3-10699-5p, соответственно. Ген *ITGB1* имел кластер для четырех сайтов связывания 91 нт по 121 нт. Ген *SOX4* имел 11 сайтов

связывания из них два кластера по два сайта связывания.

Средняя величина свободной энергии взаимодействия всех miRNA с mRNAs в CDS составляла -120,4 кДж/моль. Из 25 miRNA 14 miRNA связывались с mRNAs соответствующих генов мишеней со свободной энергией взаимодействия более -120 кДж/моль (таблица 35), что позволяет рекомендовать данные miRNA в качестве маркеров для диагностики рака молочной железы субтипов luminal A и B.

В 3'UTR участке mRNA гена *EZH1* имелось три сайта связывания для разных miRNA (таблица 36). Для *HMGA2* имелся кластер для трех сайтов связывания от 1261 нт по 1275 нт.

Таблица 36 - Характеристики взаимодействия miRNA в 3'UTR mRNA субтипов luminal A и B [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
EZH1	miR-17-39273-3p	3085	-115	89	23
	miR-9-26506-3p	3699	-110	90	22
	miR-19-43614-3p	3832	-125	91	23
HMGA2	miR-2-6081-3p	1255	-113	90	23
	miR-13-35476-3p (2)	1261 ÷ 1268	-117	90	22
	miR-19-43804-3p	1275	-115	95	21
ITGA6	miR-4-13401-5p	5720	-96	92	22
SMAD3	miR-6-16980-5p	2070	-127	91	23
	miR-15-38620-5p	2072	-119	90	22
	miR-17-12804-3p	2075	-113	93	20
	miR-14-35670-5p	4330	-119	89	23
SOX4	miR-11-29077-3p	2428	-123	88	24
	miR-2-5674-3p	2994	-123	89	23
	miR-17-39011-3p	3000	-125	95	23
	miR-X-48174-3p	3000	-127	90	24
	miR-1-2558-3p	3001	-115	92	22
TGFB1	miR-9-13610-3p	2060	-123	94	21
	miR-17-12804-3p	2062	-113	93	20
	miR-8-24549-5p	2066	-125	88	24
	miR-15-38620-5p	2089	-119	90	22
	mir-1-2121-3p	2093	-140	89	25
TNC	miR-2-4826-5p	8073	-115	92	23

*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Гены *ITGA6, TNC* имели по одному сайту связывания. Для гена *SMAD3* имелось четыре сайта связывания, из них три образовывали кластер из трех miRNA. mRNA генов *SOX4, TGFB1* имели по пять сайтов связывания, где для гена *TGFB1* имелся кластер сайтов связывания для пяти miRNA, а для *SOX4* кластер для четырех сайтов связывания.

Средняя величина свободной энергии взаимодействия всех miRNA с

mRNA в 3'UTR составляла -118,9 кДж/моль. Из 22 miRNA девять miRNA связывались с mRNA соответствующих генов мишеней со свободной энергией взаимодействия более -120 кДж/моль (таблица 36). Ассоциации этих miRNA с их генами мишенями рекомендуются использовать в качестве маркеров для диагностики субтипов luminal A и B.

В таблице 37 приведены схемы взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипов luminal A и B. Взаимодействие нуклеотидов происходит по всей длине, за исключением отсутствия образования водородных связей между пуринами (A, G) или пиримидинами (C, U). Взаимодействия неканонических пар нуклеотидов A-C и G-U учитывается программой MirTarget, что повышает свободную энергию взаимодействия miRNA с mRNA.

Таблица 37 - Схемы сайтов связывания miRNA с кандидатными генами субтипов luminal A и B [281, с. 30-48].

ANGPTL4;miR-19-43315-5p;CDS;259; -134;100 5'-AGCGCUCAGGGCGGACCCGUGCA-3' 3'-UCGCGAGUCCCGCCUGGGCACGU-5'	*FOXA1*;miR-4-12154-5p;CDS;1129;-125;87 5'-GG**G**GCCGGCGGCGG**G**GGCG**G**GA**G**C-3' 3'-CC**U**CGGCCGCCGCC**U**CGGC**U**C**C**C**A**-5'
FOXA1;miR-9-20317-3p;CDS;1150;-134;90 5'-**A**GCGGA**A**GCGG**G**GGC**A**GCGGCGCC-3' 3'-**C**CGCCU**C**CGCC**U**CCG**C**CGCCGCGG-5'	*LOX*;miR-3-11226-3p; CDS; 533; -113; 88 5'-A**G**GUGU**U**CAGCUUGCUG**A**GCCUG-3' 3'-U**U**CACA**G**GUCGAUCGAC**C**CGGAC-5'
SMAD3;miR-15-11315-5p;5'UTR;194; -117;100 5'-GCGACCGCGGCAGGCCCCG-3' 3'-CGCUGGCGCCGUCCGGGGC-5'	*SMAD3*;miR-17-12804-3p;3'UTR;2075; -113;93 5'-GCCCCGCCCCG**C**C**C**CGCCCC-3' 3'-CGGGGCGGGGA**A**G**A**GCGGGG-5'
SOX4;miR-2-6184-3p;CDS;883;-118;90 5'-UC**G**CCUCCUCC**C**CCACGCCCGGC-3' 3'-AG**U**GGAGGAGG**A**GGUGAGGGACG-5'	*TNC*;miR-14-35161-5p;3'UTR;7856;-113;85 5'-ACACUUUGGGAG**G**CC**A**AGG**UG**GGA-3' 3'-UGUGAAACCCUC**U**CG**C**UCC**GU**CCU-5'
*Примечание: Ген; miRNA; начало сайта связывания; участок miRNA; свободная энергия взаимодействия (ΔG, кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

3.7 Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative

3.7.1 Характеристики сайтов связывания miRNA из miRBase с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative

Двадцать пять кандидатных генов субтипа triple-negative служили мишенями для miRNA (таблица 38). Многие из них имели сайты связывания для нескольких miRNA. При равных концентрациях этих miRNA и mRNA гена будет наблюдаться существенное подавление синтеза белка теми miRNA, которые сильнее связываются с mRNA.

Таблица 38 - Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative [280, с. 52-66].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
ATM	miR-5095	9787	-108	93	21
ATM	miR-619-5p	9793	-119	98	22
ATM	miR-5096	9882	-104	92	21
ATM	miR-5585-3p	9950	-110	95	22
ATM	miR-1273a	11054	-119	90	25
ATM	miR-1273g-3p	11076	-113	96	21
ATM	miR-1273e	11119	-108	93	22
AXL	miR-6743-5p	124**	-117	90	22
AXL	miR-7152-3p	2620*	-106	94	20
AXL	miR-6086	2792*	-106	94	20
AXL	miR-1273g-3p	3323	-115	98	21
AXL	miR-3929	3518	-110	90	23
BIRC5	miR-5095	352*	-106	91	21
CBL	miR-1908-3p	30**	-121	92	21
CBL	miR-1273a	7727	-117	89	25
CBL	miR-1273g-3p	7749	-115	98	21
CBL	miR-1470	9246	-115	90	21
CBL	miR-4743-5p	9822	-113	87	23
CD44	miR-4763-3p	354**	-121	85	24
CEACAM5	miR-1291	2159*	-113	85	24
CEACAM5	miR-5585-3p	2441	-108	93	22
CEACAM5	miR-5095	3229	-115	98	21
CEACAM5	miR-619-5p	3235	-119	98	22
CEACAM5	miR-5585-3p	3378	-113	96	22
ERBB3	miR-619-5p	4950	-117	96	22
ERBB3	miR-619-5p	5104	-121	100	22
ERBB3	miR-1322	5632	-87	85	19
F2RL1	miR-619-5p	1943	-110	91	22
F2RL1	miR-5096	2016	-104	92	21
FGFR2	miR-6749-5p	405**	-119	92	22
FGFR2	miR-1322	504**	-87	85	19
FIS1	miR-1273g-3p	14**	-110	95	21
FIS1	miR-6892-3p	17**	-110	93	21
FIS1	miR-1914-3p	230**	-117	90	22
FIS1	miR-933	506**	-117	93	22
FIS1	miR-6756-5p	1156*	-123	92	23
IAPP	miR-619-5p	804	-117	96	22
IAPP	miR-5096	876	-113	100	21
IAPP	miR-5585-3p	944	-108	93	22
IL11	miR-328-5p	216**	-125	91	23
IL11	miR-4436b-5p	1253	-113	90	22
IL11	miR-1273f	1466	-102	98	19
IL11	miR-1273d	1467	-121	89	25
IL11	miR-1273e	1476	-113	96	22

Продолжение таблицы 38

1	2	3	4	5	6
IL11	miR-619-5p	1988	-113	93	22
JHDM1D	miR-7158-5p	28*	-115	86	24
JHDM1D	miR-6729-5p	94*	-117	89	22
LAMC1	miR-3187-5p	652*	-115	87	23
LASP1	miR-149-5p	734*	-115	90	23
MAGEA10	miR-1273g-3p	2145	-108	93	21
MAGEA10	miR-1273d	2179	-117	86	25
MAGEA10	miR-1273e	2188	-110	95	22
MID1	miR-6735-5p	2115*	-119	86	25
MMP2	miR-1285-5p	1376*	-104	92	21
MMP2	miR-328-5p	3009	-119	86	23
PFN1	miR-6867-5p	1160	-110	91	23
PRKCE	miR-328-5p	2558	-119	86	23
PRKCE	miR-6831-5p	2563	-110	85	24
PRRT2	miR-6743-5p	1379*	-115	89	22
RUNX1	miR-6089	1431**	-127	86	24
RUNX1	miR-466	5456	-106	91	23
RUNX1	miR-466	5460	-110	95	23
SERPINE1	miR-4758-3p	277*	-119	90	23
SFN	miR-638	40**	-127	86	25
SFN	miR-6089	826	-129	87	24
SFN	miR-6846-5p	839	-113	91	22
SFN	miR-466 (2)	1190 ÷ 1200	-106	91	23
STMN1	miR-1273a	1729	-115	87	25
STMN1	miR-1273g-3p	1751	-108	93	21
STMN1	miR-1268a	1855	-102	94	18
STMN1	miR-1972	1991	-117	95	22
*Примечание. Без * - 3'UTR, * - CDS, ** - 5'UTR. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.					

mRNA гена *ATM* содержала семь сайтов связывания для уникальных miRNA: miR-5095, miR-619-5p, miR-5096, miR-5585-3p, miR-1273a, miR-1273g-3p, которые все связываются в 3'UTR (таблица 38). Контроль экспрессии гена *ATM* вместе с определением уровня miR-5095, miR-619-5p, miR-5096, miR-5585-3p, miR-1273a, miR-1273g-3p и miR-1273e с высокой вероятностью будет характеризовать развитие рака молочной железы по субтипу triple-negative и появление метастазов в лимфоузлах, в которых ген *ATM* высоко экспрессируется. Приведенные в таблице 38 данные свидетельствуют о сильном контроле экспрессии гена *ATM* от указанных выше уникальных miRNA. Особенность гена *ATM* заключается в том, что все сайты связывания miRNA расположены в 3'UTR его mRNA.

mRNA гена *AXL*, рецептора тирозин киназы, имела пять сайтов связывания для пяти miRNA, которые локализованы в 3'UTR, CDS и 5'UTR.

miR-1273g-3p была практически полностью комплементарна mRNA (таблица 38). На основе приведенных данных экспрессия гена *AXL* может существенно контролироваться miR-6743-5p, miR-1273g-3p, miR-3929, miR-6086 и miR-7152-3p, три из которых кодируются в межгенных участках, то есть экспрессируются независимо.

Уникальные miRNA miR-1273a, miR-1273g-3p имели сайты связывания в mRNA протоонкогена *CBL*. Из пяти miRNA наибольшей эффективностью регуляции экспрессии гена *CBL* может обладать miR-1908-3p, связывающаяся с mRNA со свободной энергией равной -121 кДж/моль. Отметим, что связывание miRNA в 5'UTR mRNA позволяет останавливать синтез белка в начале этого процесса, чтобы не тратить энергию на синтез полипептида, который может быть прерван в результате сильного связывания miRNA. mRNA гена *CBL* содержала сайты связывания miRNA, кодирующие олигопетиды HHHHHHH, DDDDD и PPPPPP в белке CBL. Характеристики сайтов связывания miRNA, кодирующих эти олигопептиды, не приведены в таблице 30, поскольку они связываются с меньшей свободной энергией, но при их концентрации большей, чем концентрация mRNA, они существенно могут подавлять трансляцию.

mRNA гена *CEACAM5* содержала сайты связывания miR-5095, miR-619-5p, miR-5585-3p с высокой степенью комплементарности: величина ΔG/ΔGm изменялась от 85% до 98%. Сайты связывания этих miRNA находились в ограниченном участке mRNA.

mRNA генов *F2RL1* и *IAPP* имели сайты связывания преимущественно для miR-5095, miR-619-5p, miR-5585-3p, miR-5096. Причем, miR-5096 была полностью комплементарна сайту связывания miRNA в mRNA гена *IAPP* (таблица 38).

miR-6089 с высокой свободной энергией связывания взаимодействовала с mRNA генов мишеней *RUNX1* и *SFN*. По этой причине miR-6089 может использоваться как маркер для диагностики субтипа triple-negative. mRNA генов *RUNX1* и *SFN* кроме связывания miR-6089 имели сайты связывания для miR-466, которая тоже рекомендуется в качестве маркера, поскольку имеет множественные сайты связывания в mRNA гена *RUNX1*.

mRNA гена *IL11* имела сайты связывания для шести miRNA (таблица 38), из которых miR-619-5p и miR-1273a, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f выше уже рекомендованы как участники ассоциаций для маркеров. Некоторые из этих miRNA связываются с mRNA гена *MAGEA10* и *STMN1* (таблица 38), что подтверждает необходимость контроля их концентрации для установления развития заболевания по субтипу triple-negative.

mRNA гена *ERBB3* эффективно связывала miR-619-5p в двух сайтах, в одном сайте даже с полной комплементарностью. Кроме этого, miR-1322 имела множественные сайты в mRNA, что ставит экспрессию гена *ERBB3* в сильную зависимость от этих miRNA.

На основании полученных данных (таблица 38) в качестве маркеров необходимо контролировать экспрессию кандидатных генов субтипа triple-

negative со следующими miRNA: miR-5095, miR-619-5p, miR-5585-3p,miR-5096 и miR-1273a, miR-1273e, miR-1273g-3p.

В таблице 39 приведены схемы и характеристики связывания некоторых miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative рака молочной железы. Эти данные показывают, что во всех случаях происходит связывание miRNA с mRNA без нарушения двухцепочечной структуры, так как при взаимодействии не канонических пар нуклеотидов A-C и G-U не происходит изменения расстояния между цепочками RNA.

Таблица 39 - Схемы взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative рака молочной железы [280, с. 52-66].

ATM;miR-619-5p;3'UTR;9793;-119;98 5'-GGCUCA**C**GCCUGUAAUCCCAGC-3' 3'-CCGAGU**A**CGGACAUUAGGGUCG-5'	*AXL*;miR-1273g-3p;3'UTR;3323;-115;98 5'-C**C**CAGGCUGGAGUGCAGUGGU-3' 3'-G**A**GUCCGACCUCACGUCACCA-5'
CBL;miR-1273g-3p;3'UTR;7749;-115;98 5'-C**C**CAGGCUGGAGUGCAGUGGU-3' 3'-G**A**GUCCGACCUCACGUCACCA-5'	*CEACAM5*;miR-5095;3'UTR;3229;-115;98 5'-CGCGGUGG**C**UCACGCCUGUAA-3' 3'-GCGCCACC**A**AGUGCGGACAUU-5'
CEACAM5;miR-619-5p;3'UTR;3235;-115;98 5'-CGCGGUGG**C**UCACGCCUGUAA-3' 3'-GCGCCACC**A**AGUGCGGACAUU-5'	*F2RL1*;miR-619-5p;3'UTR;1943;-110;91 5'-GCCUCAUGCCUGUAAUCC**U**AGC-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAGG**G**UCG-5'
IAPP;miR-5096;3'UTR;876;-113;100 5'-GCCUGACCAACAUGGUGAAAC-3' 3'-CGGACUGGUUGUACCACUUUG-5'	*ATM*;miR-1273e;3'UTR;11119;-108;93 5'-UC**UG**C**C**UCCUGGGUUCAAGCAA-3' 3'-AG**GU**G**A**AGGACCCAAGUUCGUU-5'
ERBB3;miR-619-5p;5104;3'UTR;-121;100 5'-GGCUCAUGCCUGUAAUCCCAGC-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG-5'	*IL11*;miR-1273e;3'UTR;-113;96 5'-UCCAC**C**UCC**C**GGGUUCAAGCAA-3' 3'-AGGUG**A**AGG**A**CCCAAGUUCGUU-5'
IL11;miR-1273f;1466;3'UTR;-102;98 5'-CACUGCAACCUCCA**C**CUCC-3' 3'-GUGACGUUGGAGGU**A**GAGG-5'	*ERBB3*;miR-619-5p;4950;3UTR;-117;96 5'-GGCUCAUGCCUGUAAUC**U**CAGC-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAG**G**GUCG-5'
MAGEA10;miR-1273e;2188;3'UTR;-110;95 5'-UCC**G**C**C**UCCUGGGUUCAAGC**G**A-3' 3'-AGG**U**G**A**AGGACCCAAGUUCG**U**U-5'	*MAGEA10;*miR-1273f;2178;3'UTR;-96;92 5'-GCCUCAUGCCUGUAAUCC**U**AGC-3' 3'-CCGAGUACGGACAUUAGG**G**UCG-5'
*Примечание: Ген; miRNA; начало сайта связывания; участок miRNA; свободная энергия связывания (ΔG, кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

Эти схемы демонстрируют преимущество программы MirTarget перед обычно используемыми программами, при определении свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, которая вычисляется с учетом образования неканонических пар нуклеотидов A и C, G и U.

3.7.2 Характеристики сайтов связывания miRNA (Londin et al.) с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative

Двадцать кандидатных генов субтипа triple-negative рака молочной железы были мишенями для 47 miRNA (таблица 40). В 5’UTR генов *BIRC5, FGFR2, NTRK2* были расположены по два сайта связывания miRNA, а в mRNA гена *PFN1* два кластера по две miRNA.

Ген *CBL* был мишенью пяти miRNA, две из которых имели по четыре сайта связывания. Кластер сайтов связывания пяти miRNA расположен с 16 нт по 52 нт. Все сайты связывания miRNA имели суммарную длину равную 247 нт. Размер кластера составлял 29 нт. При длине 5’UTR гена *CBL*, равной 142 нт, необходимость кластерной организации сайтов связывания miRNA очевидна.

Таблица 40 - Характеристики взаимодействия miRNA в 5'UTR mRNA субтипа triple-negative [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
ANXA3	miR-6-17875-3p	132	-117	90	23
AXL	miR-17-40012-5p	131	-115	93	21
BIRC5	miR-16-35004-5p	110	-125	89	23
	miR-16-36548-3p	110	-125	89	23
CBL	miR-9-20317-3p (4)	16 ÷ 25	-134 ÷ -140	90 ÷ 94	24
	miR-17-39416-3p (4)	17 ÷ 26	-121	92	22
	miR-5-15733-3p	28	-138	93	24
	miR-1-1819-3p	32	-125	91	23
	miR-3-9439-3p	34	-110	98	18
CD44	miR-16-40163-5p	129	-121	90	23
	miR-6-7754-5p	376	-113	91	21
ERBB3	miR-1-163-3p	114	-113	93	21
FGFR2	miR-7-21139-3p	48	-132	89	24
	miR-19-34067-3p	60	-123	92	23
	miR-1-2228-3p	152	-125	89	24
FN1	miR-19-43437-5p	109	-115	90	23
IL11	miR-2-4531-3p	384	-106	91	21
LAMC1	miR-19-43342-3p	51	-119	90	22
	miR-10-13655-3p	115	-123	91	22
LASP1	miR-16-36476-5p	68	-119	90	22
	miR-5-16438-3p	206	-119	90	22
MMP2	miR-1-1819-3p	110	-123	89	23
	miR-17-39416-3p	113	-121	92	22
	miR-7-20203-3p	115	-121	90	22
	miR-9-27797-5p	124	-127	90	24
	miR-9-24743-3p	125	-117	89	23
	miR-2-6328-5p	264	-117	89	23
MTCH2	miR-5-15926-3p	74	-123	94	22
NTRK2	miR-17-39416-3p	61	-125	95	22

Продолжение таблицы 40

1	2	3	4	5	6
	miR-5-15564-3p	65	-127	92	22
	miR-10-13940-3p	171	-110	96	18
PFN1	miR-3-8242-5p	78	-119	89	23
	miR-9-23803-5p	78 ÷ 84	-123 ÷ -129	88 ÷ 92	24
	miR-19-42375-3p	436	-113	93	21
	miR-3-10870-3p	507	-115	92	21
	miR-3-9317-3p	511	-115	93	22
PRRT2	miR-X-48174-3p	51	-125	88	24
PTGS2	miR-9-23969-3p	108	-123	92	21
RAB5A	miR-12-32603-3p	137	-113	90	23
	miR-6-17815-3p	184	-132	89	24
	miR-X-48174-3p	189	-127	90	24
	miR-2-6862-5p	191	-121	89	23
	miR-2-3313-3p	325	-140	88	25
	miR-9-28523-5p	328	-121	97	20
	miR-1-155-3p	334	-127	92	22
RUNX1	miR-5-14114-5p	1417	-123	89	23
SERPINE1	miR-16-38458-3p	30	-123	88	24
*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.					

В 5’UTR гена *MMP2* длиной 311 нт связывались пять miRNA с наложением сайтов связывания. В результате при общей длине 114 нт они занимали участок mRNA длиной 38 нт, то есть в три раза меньше общей длины сайтов связывания.

Ген *RAB5A* был мишенью семи miRNA, из которых по три miRNA образовывали два кластера. В результате шесть сайтов связывания длиной 138 нт компактизовались в участок длиной 61 нт, которая значительно меньше длины 5’UTR гена *RAB5A.*

Средняя величина свободной энергии связывания всех miRNA равнялась -123,5 кДж/моль. Свободную энергию связывания более -123 кДж/моль имели 16 miRNA. Ассоциации этих miRNA с соответствующими генами мишенями рекомендуется использовать в качестве маркеров для разработки методов ранней диагностики субтипа triple-negative рака молочной железы.

Из 47 кандидатных генов субтипа triple-negative в CDS mRNA имели сайты связывания 12 генов (таблица 41). Только в mRNA гена *MMP2* miR-19-43421-5p и miR-17-39037-3p имели сайты связывания с наложением нуклеотидных последовательностей. Средняя величина свободной энергии взаимодействия всех miRNA с mRNA равнялась -114,1 ± -7,9 кДж/моль. Только miR-11-29461-3p, miR-21-45324-5p и miR-2-3962-5p взаимодействовали со свободной энергией более -120 кДж/моль с mRNA генов *CBL, MMP2* и *SERPINE1*, соответственно. Эти три ассоциации miRNA и генов можно использовать в качестве маркеров для диагностики субтипа

triple-negative рака молочной железы.

Таблица 41 - Характеристики взаимодействия miRNA в CDS mRNA субтипа triple-negative [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайтов, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
ATG4D	miR-10-12491-5p	239	-115	89	23
AXL	miR-1-875-3p	2838	-115	90	22
CBL	miR-11-29461-3p	176	-125	89	23
FH	miR-13-33973-3p	939	-104	91	22
FN1	miR-6-16740-5p	1392	-110	90	22
JHDM1D	miR-3-8153-3p	95	-113	91	21
LAMC1	miR-6-18496-3p	388	-119	90	22
MMP2	miR-21-45324-5p	379	-125	91	23
	miR-19-43421-5p	1681	-108	91	21
	miR-17-39037-3p	1691	-113	90	22
MSN	miR-1-1585-3p	821	-96	92	21
PARP1	miR-19-36095-3p	1275	-119	90	23
PRRT2	miR-12-31369-5p	343	-108	89	23
	miR-19-41746-3p	1081	-117	90	23
SERPINE1	miR-2-3962-5p	542	-125	88	24
*Примечание. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера.					

Шестнадцать кандидатных генов имели в 3'UTR своих mRNA сайты связывания 38 miRNA (таблица 42). В 3'UTR генов *RUNX1* и *STMN1* выявлены кластеры сайтов связывания по две miRNA.

3'UTR *SFN* содержала кластер сайтов связывания шести miRNA в участке с 1179 нт по 1231 нт длиной 53нт. Сумма длин всех сайтов связывания miRNA равна 366 нт. Благодаря кластеризации сайтов связывания шести miRNA участок, занимаемый ими, составляет только 10% от длины 3'UTR *SFN* равной 498 нт.

Таблица 42 - Характеристики взаимодействия miRNA в 3'UTR mRNA субтипа triple-negative [281, с. 30-48].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
ARHGAP19	miR-3-8671-3p	2305	-96	90	22
ATM	miR-7-21133-5p	9778	-121	89	24
	miR-10-26483-5p	11069	-110	90	22
AXL	miR-12-31899-3p	3071	-102	91	22
	miR-17-39935-3p	3313	-104	91	21
CBL	miR-4-13015-5p	3219	-102	91	22
	miR-2-4804-5p	7728	-117	93	24
	miR-2-5355-3p	7984	-115	90	22

Продолжение таблицы 42

1	2	3	4	5	6
DRAM1	miR-2-5411-3p	2045	-102	89	23
	miR-22-45335-5p	2984	-113	90	23
IAPP	miR-14-35161-5p	824	-117	89	24
	miR-22-45902-3p	992	-110	91	22
IL11	miR-17-34996-5p	1470	-113	91	23
JHDM1D	miR-9-27051-5p	5526	-102	92	23
LASP1	miR-10-27287-3p	1287	-108	93	20
	miR-15-36862-3p	3899	-108	89	23
MID1	miR-22-45438-5p	5669	-106	93	22
MYL9	miR-19-43662-5p	639	-121	93	23
	miR-X-46723-3p	1083	-115	93	21
NTRK2	miR-11-26830-5p	7962	-106	91	22
PFN1	miR-16-37915-3p	1240	-123	89	24
RUNX1	miR-4-11239-3p	3123	-115	93	20
	miR-1-2558-3p	3368	-117	93	22
	miR-15-36862-3p (2)	5454 ÷ 5464	-108 ÷ -113	89 ÷ 93	23
	miR-10-29282-3p	5464	-108	93	23
SFN	miR-19-30988-5p	835	-129	90	23
	miR-20-44122-5p	945	-108	91	22
	miR-12-31413-3p	1179	-104	89	23
	miR-6-17487-3p	1188	-113	90	23
	miR-15-36862-3p (6)	1190 ÷ 1200	-108	89	23
	miR-10-29282-3p (6)	1190÷ 1202	-104	89	23
	miR-19-42814-5p (2)	1203 ÷ 1205	-104 ÷ -106	89 ÷ 91	23
	miR-6-17605-3p	1210	-108	91	21
STMN1	miR-5-17240-3p	1096	-119	89	23
	miR-7-13347-5p	1730	-106	91	22
	miR-10-26483-5p	1744	-113	91	22
	miR-2-5355-3p	1987	-119	93	22

*Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miRNA с mRNA. Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Средняя свободная энергия взаимодействия miRNA с mRNA генов мишеней в 3'UTR была низкой -106,9 кДж/моль. Только при взаимодействии miR-19-43662-5p, miR-16-37915-3p и miR-19-30988-5p с mRNA, соответствующих генов *MYL9, PFN1* и *SFN* величина свободной энергии была больше -120 кДж/моль. Ассоциации этих miRNA с соответствующими генами мишенями рекомендуется использовать в качестве маркеров для разработки методов ранней диагностики субтипа triple-negative рака молочной железы.

В таблице 43 приведены схемы взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative. Во всех случаях взаимодействие нуклеотидов происходит по всей длине, за исключением отсутствия образования водородных связей между пуринами (A, G) или пиримидинами

(C, U).

Таблица 43 - Схемы сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа triple-negative [281, с. 30-48].

ATM;miR-7-21133-5p;3'UTR;9778;-121;89 5'-**C**GGGCUGGGC**G**CAGCGGCUCAC**GC**-3' 3'-**A**CCCGACCCG**U**GUCCCCGAGUG**UA**-5'	*CEACAM5*;miR-7-21133-5p;3'UTR;3220;-119;87 5'-UGGGC**C**GGGC**G**C**G**GUGGCUCAC**GC**-3' 3'-ACCCG**A**CCCG**U**G**U**CCCCGAGUG**UA**-5'
ERBB3;miR-1-163-3p;5'UTR;115;-110;91 5'-C**C**C**G**G**A**CUCCGGCUCCG**G**CUC-3' 3'-G**A**G**U**C**C**GAGGCCGAGGC**U**GAG-5'	*ERBB3*;miR-14-35161-5p;3'UTR;4970;-113;86 5'-**G**CACUUUGGGAG**G**C**U**GAGGCAG**A**A-3' 3'-**U**GUGAAACCCUC**U**C**G**CUCCGUC**C**U-5'
FH;miR-13-33973-3p;CDS;939;-104;91 5'-GGUUG**C**UGCAAAAGU**GG**CUGC**A**-3' 3'-CCAAC**A**ACGUUUUCA**UU**GACG**C**-5'	*IL11*;miR-17-34996-5p;3'UTR;1470;-113;91 5'-GCAA**C**CUC**C**ACCUC**C**CGGGUUCA-3' 3'-CGUU**A**GAG**A**AGGAG**A**GCCCAAGU-5'
NTRK2;miR-9-20317-3p;5'UTR;63;-129;87 5'-**A**GC**A**GAGGCGGCGGCGGCGGCUCC-3' 3'-**C**CG**C**CUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5'	*PFN1*;miR-9-23803-5p;5'UTR;84;-129;92 5'-GGCGCAGGCGCAGGCGC**G**G**G**C**AC**A-3' 3'-CCGCGUCCGCGUCCGCG**U**C**U**G**CA**U-5'
*Примечание: Ген; miRNA; начало сайта связывания; участок miRNA; свободная энергия взаимодействия (ΔG, кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

Все приведенные в таблице 43 ассоциации miRNA и mRNA можно рекомендовать для разработки диагностических маркеров.

3.8 Предсказание кластеров сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов

Субтип HER2 рака молочной железы

Двадцать три miRNA связывались в 5'UTR mRNA трех генов-кандидатов субтипа HER2 рака молочной железы (таблица 44).

Таблица 44 - Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов субтипа HER2 рака молочной железы [282, 283, 284].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
EPOR	TJU_CMC_MD2.ID01633.3p-miR	77	-108	91	21
	TJU_CMC_MD2.ID01599.3p-miR	79	-119	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID01626.3p-miR	80	-129	90	23
MAZ	TJU_CMC_MD2.ID00968.3p-miR	16	-117	93	20
	TJU_CMC_MD2.ID01476.3p-miR	16	-134	91	23
	miR-1470	18	-123	97	21
	TJU_CMC_MD2.ID00620.3p-miR	27	-127	91	23

Продолжение таблицы 44

1	2	3	4	5	6
	miR-6850-5p	92	-115	87	22
	miR-4466	107	-110	98	18
	miR-762	111	-123	91	22
	TJU_CMC_MD2.ID00915.3p-miR	112	-127	88	24
	TJU_CMC_MD2.ID02979.5p-miR	114	-121	92	22
NISCH	TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR	31	-125	88	24
	TJU_CMC_MD2.ID01560.3p-miR	38	-123	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID03119.5p-miR	41	-125	88	24
*MAPK3**	TJU_CMC_MD2.ID00149.3p-miR	1144	-117	93	22
	TJU_CMC_MD2.ID01748.3p-miR	1144	-110	91	21
	miR-6805-3p	1145	-117	87	23
*MAZ**	miR-6729-5p	361	-115	87	22
	TJU_CMC_MD2.ID02623.3p-miR	363	-125	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID02460.5p-miR	372	-119	92	22
	miR-2861	375	-110	95	19
	TJU_CMC_MD2.ID02294.5p-miR(3)	457 ÷ 469	-134 ÷ -138	91 ÷ 94	24
	TJU_CMC_MD2.ID02986.5p-miR	459	-119	93	21
	TJU_CMC_MD2.ID01819.5p-miR	461	-125	87	25
	TJU_CMC_MD2.ID01804.3p-miR(2)	464 ÷ 467	-140	88	25
	TJU_CMC_MD2.ID02064.5p-miR	489	-121	92	21
	TJU_CMC_MD2.ID02538.3p-miR	489	-125	94	22
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	500	-138	88	25
	miR-3960	505	-119	95	20
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	506	-132	89	24
	miR-4706	605	-123	87	25
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	608	-134	90	24
	TJU_CMC_MD2.ID01705.3p-miR	608	-117	92	21
	miR-3960	612	-117	93	20
	TJU_CMC_MD2.ID01768.3p-miR	893	-113	90	22
	TJU_CMC_MD2.ID01911.5p-miR	900	-123	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID00849.3p-miR	901	-125	97	22
*BRCA2***	TJU_CMC_MD2.ID00112.5p-miR	10722	-102	91	21
	TJU_CMC_MD2.ID02744.3p-miR	10738	-104	92	22
	miR-619-5p	10746	-117	96	22
*CDK6***	miR-548h-3p	1677	-104	91	23
	miR-548z	1677	-104	91	23
	miR-548aq-3p	1678	-102	94	22
	miR-548az-3p	1678	-98	94	21
	TJU_CMC_MD2.ID03264.3p-miR	1678	-98	90	22
	miR-466(10)	1908 ÷ 1926	-104 ÷ -108	90 ÷ 93	23
	TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR(9)	1896 ÷ 1920	-104 ÷ -106	89 ÷ 91	23
	TJU_CMC_MD2.ID01030.3p-miR(7)	1900 ÷ 1918	-108 ÷ -115	89 ÷ 95	23
	TJU_CMC_MD2.ID02513.5p-miR	1901	-102	91	22

*Примечание. Гены без * - 5'UTR, гены с * - CDS, ** - 3'UTR; в скобках показано количество сайтов связывания; кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

mRNA гена *EPOR* имела три сайта связывания miRNA, нуклеотидные последовательности, которых перекрывались. Три сайта связывания TJU_CMC_MD2.ID01633.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01599.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID01626.3p-miR включали кластер из 26 нт, расположенный от 77 нт до 102 нт в 5'UTR mRNA гена *EPOR*. Без перекрывающихся сайтов длина трех miRNA составила бы 67 нт, что составляет половину длины 135 нт 5'UTR. Следовательно, компактизация сайтов связывания miRNA полезна для уменьшения доли сайтов связывания в 2,6 раза в 5'UTR mRNA гена *EPOR*.

В mRNA гена *MAZ* сайты связывания TJU_CMC_MD2.ID00968.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01476.3p-miR, miR-1470 и TJU_CMC_MD2.ID00620.3p-miR были расположены в кластере длиной 34 нт от 16 нт до 49 нт. Общая длина четырех miRNA была равна 87 нт. Другой кластер в mRNA *MAZ* длиной 44 нт был образован сайтами связывания miR-6850-5p, miR-4466, miR-762, TJU_CMC_MD2.ID00915.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID02979.5p-miR. Оба кластера занимали всего 78 нт, а общая длина сайтов связывания девяти miRNA составляла 196 нт.

В mRNA гена *NISCH* сайты связывания TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01560.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID03119.5p-miR образовывали кластер длиной 35 нт от 31 нт до 64 нт. При образовании кластеров длина этих сайтов связывания составляла 71 нт, то есть 52% длины 5'UTR, равной 134 нт.

Были обнаружены 24 miRNA, для которых mRNA имела мишени в CDS. Ген митоген-активируемой протеинкиназы три (*MAPK3*) был мишенью для трех miRNA, сайты связывания которых были расположены в кластере длиной 26 нт.

mRNA гена *MAZ* имела сайты связывания miRNA с перекрытием нуклеотидных последовательностей в четыре различных кластера. Первый кластер длиной 33 нт включал сайты связывания miR-6729-5p, TJU_CMC_MD2.ID02623.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID02460.5p-miR и miR-2861. Второй кластер длиной 74 нт располагался от 457 до 530 нт. Общая длина всех сайтов связывания miRNA этого кластера составила 302 нт. Эта длина требует компактизации сайта связывания, поскольку все нуклеотиды участвуют в кодировании функционально важных аминокислот в CDS.

Третий кластер состоял из сайтов связывания miR-4706, TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01705.3p-miR и miR-3960 длиной 30 нт. Четвертый кластер длиной 30 нт включал сайты связывания для трех miRNA от 893 до 922 нт. Все сайты связывания для miRNA, которые взаимодействуют с mRNA *MAZ*, имели общую длину 472 нт, что составляет приблизительно 33% от общей длины CDS. Кластерные сайты связывания для miRNA занимали только 12% длины CDS, равной 1434 нт. Ген *MAZ* был наиболее уязвимой мишенью для miRNA, поэтому его экспрессию следует контролировать в приоритетном порядке.

Пятнадцать miRNA имели сайты связывания с mRNA генов HER2 субтипов рака молочной железы со свободной энергией -125 кДж/моль или

более. Относительно высокая энергия взаимодействия miRNA с mRNA позволяет рекомендовать эти ассоциаций miRNA и mRNA в качестве маркеров для диагностики рака молочной железы субтипа HER2. Например, TJU_CMC_MD2.ID01626.3p-miR имеет конкурентное преимущество перед TJU_CMC_MD2.ID01633.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID01599.3p-miR для связывания в кластере mRNA *EPOR* гена. В двух кластерах mRNA *MAZ* гена преимущественно будут связываться TJU_CMC_MD2.ID01476.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID00915.3p-miR. Трансляция mRNA *MAZ* гена будет значительно подавлена, если присутствует TJU_CMC_MD2.ID02294.5p-miR (котора имела три сайта связывания), а TJU_CMC_MD2.ID01804.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR имели два сайта со свободной энергией связывания -132 кДж/моль или более.

В 3'UTR mRNA *BRCA2* гена три сайта связывания miRNA были идентифицированы с перекрыванием нуклеотидных последовательностей. Ген *CDK6* был мишенью для девяти miRNA. mRNA генов *BRCA2* и *CDK6* имела сайты связывания для miRNA в 3'UTR с низкой свободной энергией связывания: от -98 кДж/моль до -117 кДж/моль. Однако десять сайтов связывания miR-466, девять сайтов связывания TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR и семь сайтов связывания TJU_CMC_MD2.ID01030.3p-miR образовывали кластер с 1892 нт до 1901 нт. Множественные сайты связывания для этих miRNA позволяют им связываться с mRNA и значительно увеличивают ингибирование трансляции mRNA *CDK6* гена.

Компактизацию сайтов связывания miRNA трудно объяснить, если ее единственной целью является уменьшение длины 3'UTR. По-видимому, существуют и другие причины компактизации сайтов связывания. Например, связывание одной miRNA препятствует связи других miRNA с их сайтом. Если эта miRNA является сигналом гена-хозяина, ген *CDK6* не будет воспринимать этот сигнал. То есть, существует конкуренция между различными miRNA за сайт связывания и за способность регулировать экспрессию гена-мишени. Ассоциации этих miRNA с их геном мишенью *CDK6* рекомендуется использовать в качестве маркеров для диагностики подтипа HER2.

Следует отметить, что большинство сайтов связывания miRNA были расположены в начале областей 5'UTR и CDS mRNA гена *MAZ*. Такая локализация сайтов связывания miRNA позволяет раньше останавливать синтез белка в случае образования абортивных белков. Например, первые три кластера сайтов связывания miRNA были локализованы в CDS mRNA MAZ гена и составляют область от 158 нт до 477 нт. Все сайты связывания девяти miRNA в 5'UTR mRNA *MAZ* гена были расположены от 16 нт до 114 нт из 168 нт длины 5'UTR. Сайты связывания miRNA в 3'UTR mRNA генов *BRCA2* и *CDK6* также были расположены в начале 3'UTR.

В таблице 45 показаны схемы взаимодействия miRNA с mRNA генов-кандидатов субтипа HER2. Несколько miRNA и их генов-мишеней: TJU_CMC_MD2.ID02998.3p-miR и ген *MAZ*, miR-5008-5p и ген *MAZ*, TJU_CMC_MD2.ID02499.3p-miR и ген *MAZ*, miR-6805-3p и ген *MAPK3*, miR-

3960 и ген *MAZ*. miR-877-3p, miR-7111-3p, TJU_CMC_MD2.ID01352.3p-miR имели сайты связывания в одной и той же области mRNA гена *MAZ* от 2273 нт до 2774 нт. Все нуклеотиды miRNA образуют водородные связи с этой областью mRNA.

Таблица 45 - Схемы взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов субтипа HER2 [282, с. 343-345; 283, с. 20-26; 284, с. 13].

MAZ;TJU_CMC_MD2.ID02998.3p-miR; 5'UTR;22;-113;90;21 5'-**G**GUGCGC**G**GGCGGC**G**GGGCGG-3' **|**|||||||**|**||| **|**|||||| 3'-**U**CACGCG**U**CCGCCC**U**CCCGCC-5'	*MAZ*;TJU_CMC_MD2.ID02979.5p-miR; 5'UTR;114;-121;92;22 5'-CG**G**CC**C**GCGCCCCC**G**GCCCCCG-3' ||**|**||||||||||**|**|||||| 3'-GC**U**GG**A**CGCGGGGG**U**CGGGGGA-5'
MAZ;miR-5008-5p;5'UTR;133;-110;88;22 5'-CC**G**CUGAGCCCC**GG**GGGCC**C**C**G**-3' ||**|**||| |||||**|**||||||||**|** 3'-GG**U**GACACGGGG**UU**CCCGG**A**G**U**-5'	*NISCH;*TJU_CMC_MD2.ID01996.3p-miR; 5'UTR;34;-110;87;21 5'-GGGG**G**CG**A**CG**G**GCGGCGGGG**G**-3' ||||**|**||| **|**|||||||||**|** 3'-CCCC**U**GC**C**CC**U**CGCCGCCCC**U**-5'
MAZ;TJU_CMC_MD2.ID02499.3p-miR;CDS; 488;-115;89;21 5'-CCGCCG**U**CGC**U**GCC**G**CGCCCC-3' ||||||**|**||||||||**|**|| 3'-GGCGGC**G**GCG**G**CGG**U**GCUGGG-5'	*MAPK3*;miR-6805-3p;CDS;1145;-117;87;23 5'-CUGGGGGC**A**GGGGAGCAG**G**GG**GG**-3' ||||||||**|**||||||||||**|**|| **||** 3'-GACCCCCG**C**CCCCUCGUC**U**CG**UU**-5'
MAZ;miR-3960;CDS;506;-113;90;20 5'-CCCCGGCC**C**C**U**GCCGCCGCC-3' |||| |||**|**||||||||| 3'-GGGGGCGG**A**G**G**CGGCGGCGG-5'	*CDK6*;TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR; 3'UTR;1896;-104;89;23 5'-GUGUGUG**U**GU**GC**AU**G**UGUGUGU**G**-3' |||||||**|**||**|**|||||||||**|** 3'-CACACAC**G**CA**UA**UA**U**ACACACA**U**-5'
MAZ;miR-3960;CDS;614;-117;93;20 5'-CCCCCGCCUCCGCCGCC**A**C**U**-3' ||||||||||||||||||**|**||**|** 3'-GGGGGCGGAGGCGGCGG**C**G**G**-5'	*MAZ*;miR-6729-5p;CDS;361;-115;87;22 5'-GCCGCGCCGGCGCCC**C**CGCCCA-3' ||||| **|** **|** |||||**|**||||||| 3'-CGGCGAGUCGGCGGG**A**GCGGGU-5'
NISCH;miR-877-3p;CDS;2141;-102;87;21 5'-C**CA**GG**G**GGAGG**A**AGA**G**GAGGA-3' ||**|**||||||||**|**|||||||||| 3'-G**AC**CC**U**CCUCC**C**UCU**U**CUCCU-5'	*MAZ*;miR-877-3p;3'UTR;2273;-106;91;21 5'-C**CA**GG**G**GGAGGGAG**G**AGAGGA-3' ||**|**||||||||||||**|**||||||| 3'-G**AC**CC**U**CCUCCCUC**U**UCUCCU-5'
MAZ;miR-7111-3p;3'UTR;2273;-106;88;22 5'-C**CA**GG**G**GGAGGGA**G**GAGAGGAA-3' ||**|**||||||||||**|**||||||| 3'-G**AC**CC**U**CCUCCCU**U**CUCUCCUA-5'	*MAZ*;TJU_CMC_MD2.ID01352.3p-miR; 3'UTR;2274;-110;87;23 5'-**C**AGGG**G**G**A**G**G**GAGGAG**AG**GAAGG-3' ||||||**|**||**|**|||||||**|**||||| 3'-**A**UCCC**U**C**C**C**U**CUCCUC**CU**CUUCC-5'
*Примечание: Ген; miRNA; участок miRNA; начало сайта связывания (нт); свободная энергия связывания, ΔG (кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C.	

Гены *EPOR, NISCH, MAPK3, BRCA2* ассоциативно связаны с тремя miRNA, ген *MAZ* с девятью miRNA в 5'UTR и с 20 miRNA в CDS, ген *CDK6* ассоциативно связан с девятью miRNA. Таким образом для разработки методов ранней диагностики рака молочной железы субтипа HER2 рекомендуется использовать семь ассоциаций.

Субтип luminal A и B рака молочной железы

Восемнадцать сайтов связывания miRNA с перекрывающимися нуклеотидными последовательностями были идентифицированы в 5'UTR mRNA гена *FOXA1* (таблица 46). Двадцать сайтов связывания образовывали кластер длиной 52 нт от 99 нт до 151 нт. Общая длина всех 20 сайтов связывания составляла 447 нт, что длиннее, чем 5'UTR с длиной 312 нт. Все сайты связывания miRNA были расположены в первой половине 5'UTR. Поскольку длина кластера составляет 52 нт, только две miRNA могут связываться одновременно, а другие miRNA не будут влиять на экспрессию гена *FOXA1*.

Таблица 46 - Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов субтипа luminal A и B рака молочной железы [283, с. 20-26; 284, с. 13; 285].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
FOXA1	TJU_CMC_MD2.ID00297.5p-miR	99	-123	89	24
	TJU_CMC_MD2.ID02106.3p-miR	110	-123	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID00252.5p-miR	111	-140	94	24
	TJU_CMC_MD2.ID02769.5p-miR	112	-127	92	22
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	115	-140	89	25
	TJU_CMC_MD2.ID01099.5p-miR	116	-108	100	17
	TJU_CMC_MD2.ID00071.3p-miR (2)	118 ÷ 121	-117 ÷ -121	93 ÷ 97	20
	TJU_CMC_MD2.ID01190.5p-miR	118	-108	100	17
	TJU_CMC_MD2.ID02457.3p-miR	118	-108	100	17
	TJU_CMC_MD2.ID02595.5p-miR	118	-115	92	20
	TJU_CMC_MD2.ID01403.5p-miR	120	-123	91	23
	TJU_CMC_MD2.ID01702.3p-miR	120	-140	89	25
	miR-3960	120	-115	92	20
	TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR (2)	121 ÷ 122	-117	93	20
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	122	-134	90	24
	TJU_CMC_MD2.ID00457.3p-miR	124	-123	91	22
	TJU_CMC_MD2.ID00061.3p-miR	127	-129	94	22
	TJU_CMC_MD2.ID02499.3p-miR (2)	127 ÷ 130	-119 ÷ -121	92 ÷ 93	21
HMGA2	miR-3960	549	-117	93	20
	miR-6756-5p	529	-117	87	23
	TJU_CMC_MD2.ID01737.3p-miR	539	-119	93	21
	TJU_CMC_MD2.ID01041.5p-miR (2)	541 ÷ 544	-129 ÷ -134	88 ÷ 91	24
	TJU_CMC_MD2.ID00089.3p-miR	542	-125	91	22
	TJU_CMC_MD2.ID01323.3p-miR	542	-117	95	20
	TJU_CMC_MD2.ID02296.5p-miR	542	-115	93	20
	TJU_CMC_MD2.ID00296.3p-miR	544	-146	93	25
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	544	-142	96	24
	TJU_CMC_MD2.ID01403.5p-miR	547	-119	88	23
	TJU_CMC_MD2.ID00061.3p-miR	550	-132	95	22
	TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR	550	-115	92	20
	miR-4739	573	-123	87	25
	TJU_CMC_MD2.ID00425.5p-miR	575	-121	88	24

Продолжение таблицы 46

1	2	3	4	5	6
	TJU_CMC_MD2.ID00564.5p-miR	585	-110	90	22
*ITGB1**	TJU_CMC_MD2.ID02187.5p-miR	91	-127	92	23
	miR-4787-5p	92	-123	92	22
	TJU_CMC_MD2.ID00457.3p-miR	95	-123	91	22
	TJU_CMC_MD2.ID02770.5p-miR	98	-117	93	20
	TJU_CMC_MD2.ID01184.3p-miR	101	-117	93	20
*HMGA2***	TJU_CMC_MD2.ID01970.3p-miR	1255	-113	90	23
	TJU_CMC_MD2.ID00849.3p-miR (2)	1261 ÷ 1268	-117	90	22
	TJU_CMC_MD2.ID01545.3p-miR	1275	-115	95	21
*SMAD3***	miR-4690-5p	2066	-115	92	22
	miR-3620-5p (2)	2069 ÷ 2074	-117 ÷ -115	87 ÷ 89	22
	TJU_CMC_MD2.ID02822.5p-miR	2070	-127	91	23
	TJU_CMC_MD2.ID00978.5p-miR	2072	-119	90	22
	miR-6089 (2)	2073 ÷ 2078	-132 ÷ -136	89 ÷ 91	24
	TJU_CMC_MD2.ID01382.3p-miR	2075	-113	93	20
*SOX4***	TJU_CMC_MD2.ID01839.3p-miR	2994	-123	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID01282.3p-miR	3000	-125	95	23
	TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR	3000	-127	90	24
	TJU_CMC_MD2.ID00101.3p-miR	3001	-115	92	22
*TGFB1***	TJU_CMC_MD2.ID03306.3p-miR	2060	-123	94	21
	miR-6089 (4)	2060 ÷ 2095	-132 ÷ -136	89 ÷ 91	24
	TJU_CMC_MD2.ID01382.3p-miR	2062	-113	93	20
	TJU_CMC_MD2.ID03208.5p-miR	2066	-125	88	24
	miR-3620-5p	2086	-115	87	22
	TJU_CMC_MD2.ID00978.5p-miR	2089	-119	90	22
	TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR	2093	-140	89	25

*Примечание. Гены без * - miRNA сайтов связывания в 5'UTR, гены с * - miRNA сайтов связывания CDS, ** - miRNA сайтов связывания в 3'UTR; в скобках показано количество сайтов связывания; Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Формирование кластера сайтов связывания для гена *FOXA1* в 5'UTR указывает на большую способность этого гена к компактизации. Несмотря на то, что TJU_CMC_MD2.ID01099.5p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01190.5p-miR и TJU_CMC_MD2.ID02457.3p-miR полностью подавляют mRNA гена, они обладали энергией свободного взаимодействия -108 кДж/моль, что значительно меньше, чем для других miRNA. При одинаковых концентрациях всех miRNA TJU_CMC_MD2.ID00252.5p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID01702.3p-miR имели значения ΔG, равные -140 кДж/моль, что имеет преимущество в связывании с mRNA гена *FOXA1*. Ассоциации этих miRNA с mRNA гена *FOXA1* рекомендуются в качестве маркеров для диагностики субтипов luminal A и B. Средняя свободная энергия связывания miRNA, без трех miRNA длиной 17 нт, составила -126 кДж/моль, что характерно для связывания miRNA в 5'UTR.

В 5'UTR mRNA гена *HMGA2* было 17 сайтов связывания для 15 miRNA. Сайты связывания этих miRNA находились в кластере 95 нт от 512 нт до 606 нт. Общая длина сайтов связывания была равна 407 нт и была в 4,3 раза длиннее кластера. Сайты связывания miRNA были расположены в первой половине 5'UTR и имели значение ΔG более -125 кДж/моль. TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID00296.3p-miR имели ΔG, равную -142 кДж/моль и -146 кДж/моль, соответственно. Ассоциации этих двух miRNA с их генами-мишенями могут быть потенциальными маркерами для диагностики субтипов luminal A и B.

Ген *ITGB1* не имел 5'UTR, но кластер для пяти сайтов связывания miRNA был расположен от 91 нт до 120 нт в начале CDS длиной 30 нт, что в 3,6 раза меньше суммы длин пяти miRNA. Ассоциация TJU_CMC_MD2.ID02187.5p-miR с mRNA гена *ITGB1* является еще одним потенциальным кандидатом для диагностики субтипов luminal A и B.

Для гена *HMGA2* был кластер для четырех сайтов связывания от 1255 нт до 1295 нт, расположенных в начале 3'UTR. Длина кластера была равна 41 нт, а общая длина сайтов связывания составляла 98 нт.

Кластер из восьми сайтов связывания с 3'UTR mRNA гена *SMAD3* длиной 35 нт располагался от 2066 до 2101 нт. Следовательно, только одна miRNA может быть связана в кластере. При равных концентрациях всех шести miRNA, TJU_CMC_MD2.ID02822.5p-miR и miR-6089 имели энергию свободного взаимодействия от -127 кДж/моль до -136 кДж/моль, что дает им преимущество в связывании с кластером. Эти две miRNA позволяют использовать их в качестве маркеров для диагностики субтипов luminal A и B.

3'UTR mRNA гена *SOX4* имела четыре сайта связывания miRNA, организованных в кластере из 29 нт. TJU_CMC_MD2.ID01282.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR были связаны с mRNA с ΔG, равным -125 кДж/моль и -127 кДж/моль соответственно, и имели потенциал в качестве диагностических маркеров.

mRNA гена *TGFB1* имеет кластер сайтов связывания для семи miRNA длиной 48 нт, расположенных от 2060 нт до 2107 нт. Длина 3'UTR составляла 146 нт с 10 сайтами связывания miRNA, равными 230 нт, поэтому компактизация сайтов связывания была в 4,8 раз выше. TJU_CMC_MD2.ID03208.5p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR и особенно miR-6089, которые имели четыре сайта связывания, могут служить адекватными маркерами для диагностики субтипов luminal A и B.

В таблице 47 показаны схемы взаимодействия некоторых miRNA с mRNA нескольких генов-кандидатов субтипов luminal A и B. Представленные схемы наглядно демонстрируют преимущество программы MirTarget в прогнозировании сайтов связывания miRNA. Например, TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR образовал неканоническую пару G-U в mRNA гена *FOXA1*. Но TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR может связываться с 19 нуклеотидами mRNA, и энергия свободного взаимодействия составляла 93% от максимального значения.

Таблица 47 - Схемы взаимодействия miRNA с mRNA генов субтипов luminal A и B рака молочной железы [283, с. 20-26; 284, с. 13; 285, с. 1-4].

FOXA1;TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR; 5'UTR;122;-117;93;20 5'-CCGCGCCGCCGCCGCC**G**CCG-3' 3'-CGCGCGGCGGCGGCGG**U**GGC-5'	*HMGA2*;TJU_CMC_MD2.ID01403.5p-miR; 5UTR;547;-119;87;23 5'-C**A**C**C**CACCGC**C**GC**C**GCCGCC**A**C**C**-3' 3'-G**C**G**A**GUGGCG**A**CG**A**CGGCGG**C**G**A**-5'
HMGA2;TJU_CMC_MD2.ID01641.3p-miR; 5UTR;545;-132;89;24 5'-CCCACCCACCGCCGCCGCCGCCAC-3' 3'-GGGGUGGGGGCGGCGGCGGCGGUG-5'	*HMGA2*;TJU_CMC_MD2.ID02428.3p-miR; 5UTR;315;-108;88;22 5'-GGUGGGGGG**A**A**GAG**GA**G**GAGGA-3' 3'-CCACCCCCC**U**U**CU**CU**U**CUCCU-5'
HMGA2;TJU_CMC_MD2.ID03324.3p-miR; 5UTR;312;-110;87;22 5'-CAGGGUGGG**G**GGA**A**GAGGAGG**A**-3' 3'-CUCCCACCC**U**CCU**C**CUCCUCC**C**-5'	*SMAD3*;miR-4508;5'UTR;111;-100;94;17 5'-CGCGCGCCGAGCCCCGC-3' 3'-GCGCGCGGGUCGGGGCG-5'
FOXA1;TJU_CMC_MD2.ID02542.5p-miR; CDS;1129;-125;87;24 5'-GG**G**GCCGGCGGCGG**G**GGCG**G**GA**G**C-3' 3'-CC**U**CGGCCGCCGCC**U**CGGC**U**C**C**C**A**-5'	*FOXA1*;TJU_CMC_MD2.ID03332.3p-miR; CDS;1150;-134;90;24 5'-**A**GCGGA**A**GCGG**G**GGC**A**GCGGCGCC-3' 3'-**C**CGCCU**C**CGCC**U**CCG**C**CGCCGCGG-5'
HMGA2;TJU_CMC_MD2.ID00101.3p-miR; 3'UTR;1263;-110;88;22 5'-GGUGGGGUGGGGGAG**GG**G**GG**GG-3' 3'-CGACCCCACCCCCUC**UU**C**UU**CC-5'	*HMGA2*;TJU_CMC_MD2.ID00849.3p-miR; 3'UTR;1268;-117;90;22 5'-GGUGGG**G**GAGGGGG**G**G**G**UGGGG-3' 3'-CCACCC**U**CUCCCCC**U**C**U**CCCCC-5'
SMAD3;miR-4507;3'UTR;2066;-106;91;20 5'-CCCAGCCCAGCCCC**G**CCCCG-3' 3'-GGGUCGGGUCGGGU**U**GGGUC-5'	*SMAD3*;miR-937-5p;3'UTR;2072;-102;89;20 5'-CCAGCCCC**G**CCC**C**GCC**C**C**G**C-3' 3'-GGUCGGGG**U**GGG**A**CUG**A**G**U**G-5
TGFB1;miR-877-3p;233;5'UTR;-108;93;21 5'-CGGGGAGGAGGG**G**GA**G**GAGGA-3' 3'-GACCCUCCUCCC**U**CU**U**CUCCU-5'	*TGFB1*;miR-937-5p;2089;3'UTR;-102;89;20 5'-CC**G**GCCCCACCC**C**GCCCC**G**C-3' 3'-GG**U**CGGGGUGGG**A**CUGAG**U**G-5'
HMGA2;TJU_CMC_MD2.ID01403.5p-miR; 5'UTR;547;-119;88;23 5'-C**A**C**C**CACCGC**C**GC**C**GCCGCC**A**C**C**-3' 3'-G**C**G**A**GUGGCG**A**CG**A**CGGCGG**C**G**A**-5'	*SMAD3*;TJU_CMC_MD2.ID01020.5p-miR; 5'UTR;194;-117;100;19 5'-GCGACCGCGGCAGGCCCCG-3' 3'-CGCUGGCGCCGUCCGGGGC-5'
ANGPTL4;TJU_CMC_MD2.ID01593.5p-miR;CDS;259;-134;100;23 5'-AGCGCUCAGGGCGGACCCGUGCA-3 3'-UCGCGAGUCCCGCCUGGGCACGU-5'	*FOXA1*;TJU_CMC_MD2.ID03332.3p-miR; CDS;150;-134;90;24 5'-**A**GCGGA**A**GCGG**G**GGC**A**GCGGCGCC-3' 3'-**C**CGCCU**C**CGCC**U**CCG**C**CGCCGCGG-5'
*Примечание: Ген; miRNA; участок miRNA; начало сайта связывания (нт); свободная энергия связывания, ΔG (кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C.	

TJU_CMC_MD2.ID02542.5p-miR взаимодействовала с 23 нуклеотидами mRNA гена *FOXA1*, но имела только один неспаренный нуклеотид. Такое взаимодействие между miRNA и их генами-мишенями справедливо для следующих пар: TJU_CMC_MD2.ID00101.3p-miR и ген *HMGA2*, TJU_CMC_MD2.ID00849.3p-miR и ген *HMGA2*, miR-4507-3p и ген *SMAD3*, miR-937-5p и *TGFB1*, miR-937-5p и *SMAD3*, TJU_CMC_MD2.ID01403.5p-miR и ген *HMGA2*.

Ген *FOXA1* ассоциативно связан с 18 miRNA, ген *HMGA2* с 15 miRNA в 5'UTR и с тремя в 3'UTR, ген *ITGB1* с пятью, ген *SMAD3* с шестью, ген *SOX4* с четырьмя, ген *TGFB1* с семью miRNA. Таким образом, для разработки методов ранней диагностики рака молочной железы субтипа luminal A и B рекомендуется использовать семь ассоциаций генов.

Субтип triple-negative рака молочной железы

Ген *CBL* являлся мишенью для шести miRNA, две из которых имели четыре сайта связывания (таблица 48). Кластер из 12 сайтов связывания для шести miRNA расположен от 16 нт до 55 нт.

Все сайты связывания для miRNA имели общую длину 270 нт. Размер кластера составлял 40 нуклеотидов при длине 5'UTR mRNA *CBL* гена в 142 нт, поэтому необходимость организации кластеров сайтов связывания miRNA очевидна.

Сайты связывания miRNA с mRNA компактизованы в 6,8 раз. Средняя свободная энергия взаимодействия шести miRNA с mRNA гена *CBL* составила -127 кДж/моль.

Таблица 48 - Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA субтипа triple-negative рака молочной железы [283, с. 20-26; 284, с. 13].

Ген	miRNA	Начало сайта, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
CBL	TJU_CMC_MD2.ID03332.3p-miR(4)	16 ÷ 25	-134 ÷ -140	90 ÷ 94	24
	TJU_CMC_MD2.ID01310.3p-miR(4)	17 ÷ 26	-121	92	22
	TJU_CMC_MD2.ID02761.3p-miR	28	-138	93	24
	miR-1908-3p	30	-121	92	21
	TJU_CMC_MD2.ID00278.3p-miR	32	-125	91	23
	TJU_CMC_MD2.ID02430.3p-miR	34	-110	98	18
MMP2	TJU_CMC_MD2.ID00278.3p-miR	110	-123	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID01310.3p-miR	113	-121	92	22
	TJU_CMC_MD2.ID03037.3p-miR	115	-121	90	22
	TJU_CMC_MD2.ID03345.5p-miR	124	-127	90	24
	TJU_CMC_MD2.ID03368.3p-miR	125	-117	89	23
RAB5A	TJU_CMC_MD2.ID02930.3p-miR	184	-132	89	24
	TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR	189	-127	90	24
	TJU_CMC_MD2.ID01859.5p-miR	191	-121	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID01804.3p-miR	325	-140	88	25
	TJU_CMC_MD2.ID03367.5p-miR	328	-121	97	20
	TJU_CMC_MD2.ID00061.3p-miR	334	-127	92	22

Продолжение таблицы 48

1	2	3	4	5	6
*ATM***	TJU_CMC_MD2.ID03006.5p-miR	9778	-121	89	24
	miR-5095	9787	-108	93	21
	miR-619-5p	9793	-119	98	22
	miR-1273a	11054	-119	90	25
	TJU_CMC_MD2.ID00367.5p-miR	11069	-110	90	22
	miR-1273g-3p	11076	-113	96	21
*CBL***	miR-1273a	7727	-117	89	25
	TJU_CMC_MD2.ID01838.5p-miR	7728	-117	93	24
	miR-1273g-3p	7749	-115	98	21
*IL11***	miR-1273f	1466	-102	98	19
	miR-1273d	1467	-121	89	25
	TJU_CMC_MD2.ID01404.5p-miR	1470	-113	91	23
	miR-1273e	1476	-113	96	22
*RUNX1***	TJU_CMC_MD2.ID01030.3p-miR (2)	5454 ÷ 5464	-108 ÷ -113	89 ÷ 93	23
	miR-466 (2)	5456 ÷ 5460	-106 ÷ -110	91 ÷ 95	23
	TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR	5464	-108	93	23
*SFN***	miR-6089	826	-129	87	24
	TJU_CMC_MD2.ID01774.5p-miR	835	-129	90	23
	miR-6846-5p	839	-113	91	22
	TJU_CMC_MD2.ID00790.3p-miR	1179	-104	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID02868.3p-miR	1188	-113	90	23
	TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR	1190	-104	89	23
	miR-466 (6)	1190 ÷ 1200	-106	91	23
	TJU_CMC_MD2.ID01030.3p-miR (6)	1190 ÷ 1200	-108	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID00436.3p-miR (6)	1192 ÷ 1202	-104	89	23
	TJU_CMC_MD2.ID01727.5p-miR (2)	1203 ÷ 1205	-104 ÷ -106	89 ÷ 91	23
	TJU_CMC_MD2.ID02882.3p-miR	1210	-108	91	21
*STMN1***	miR-1273a	1729	-115	87	25
	TJU_CMC_MD2.ID03011.5p-miR	1730	-106	91	22
	TJU_CMC_MD2.ID00367.5p-miR	1744	-113	91	22
	miR-1273g-3p	1751	-108	93	21

*Примечание. Гены без * - miRNA сайтов связывания в 5'UTR, гены с * - miRNA сайтов связывания CDS, ** - miRNA сайтов связывания в 3'UTR; в скобках показано количество сайтов связывания; Кластеры сайтов связывания не разделены горизонтальными линиями внутри кластера. ÷ - изменение параметра в интервале.

Результаты предполагаемых взаимодействий шести разных miRNA с mRNA гена *CBL* можно изобразить в виде схемы, демонстрирующей расположение сайтов связывания miRNA относительно кластера в mRNA гена *CBL* (рисунок 2).

Особенностью TJU_CMC_MD2.ID03332.3p-miR является расположение начала повторяющихся сайтов связывания через три нуклеотида. Эта miRNA взаимодействует с mRNA гена, при этом смещение начала ее сайтов связывания совпадает с открытой рамкой считывания mRNA гена *CBL* (таблица 49).

```
5′-GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCCGGGAGA-3′mRNA CBL гена
3′-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5′ 16 нт
 3′-CGUCGUCUCCGCCGCCGCU-CCG-5′ 17 нт
   3′-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5′ 19 нт
    3′-CGUCGUCUCCGCCGCCGCU-CCG-5′ 20 нт
      3′-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5′ 22 нт
       3′-CGUCGUCUCCGCCGCCGCU-CCG-5′ 23 нт
         3′-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5′ 25 нт
          3′-CGUCGUCUCCGCCGCCGCU-CCG-5′ 26 нт
            3′-CCGCCGCCGCCGCCGGCGC-GGUUC-5′ 28 нт
              3′-CACC-UCGCCGCCGCCGUCCCUCC-5′ 30 нт
                3′-CACC-UCGCCGCCGCCGUCCCUCC-5′ 32 нт
                  3′-CCGCCGCCGCCGC-GGCUC-5′ 34 нт
```

*Примечание: ниже нуклеотидных последовательностей mRNA даны нуклеотидные последовательности miRNA с указанием старта их связывания согласно таблице 48.

Рисунок 2 - Расположение в mRNA гена *CBL* нуклеотидных последовательностей кластера сайтов связывания miRNA [283, с. 20-26; 284, с. 13].

Из приведенных данных (рисунок 2) видно, что с кластером может связаться не более одной miRNA, что приводит к конкуренции за связывание.

Таблица 49 - Схемы взаимодействия miRNA с mRNA *CBL* гена в кластере сайтов связывания [283, с. 20-26; 284, с. 13].

ID03332.3p-miR;5'UTR;16;-134;90;24
5'-GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGC-3'
  ||||| |||| ||||||||| |
3'-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5'
	ID03332.3p-miR;5'UTR;19;-134;90;24
	5'-GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGC-3'
	  ||||| |||| ||||||||| |
	3'-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5'

ID03332.3p-miR;5'UTR;22;-134;90;24
5'-GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGC-3'
  ||||| |||| ||||||||| |
3'-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGCGG-5'
	ID03332.3p-miR;5'UTR;25;-140;94;24
	5'-GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCC-3'
	  ||||| |||| ||||||||| ||
	3'-CCGCCUCCGCCUCCGCCGCCGC-GG-5'

ID01310.3p-miR;5'UTR;17;-121;92;22
5'-GC**G**GC**G**GCGGCGGCGGCG**G**CGGC-3'
  ||**|**||**|** ||||||||||**|** |||
3'-CG**U**CG**U**CUCCGCCGCCGC**U**-CCG-5'
	ID01310.3p-miR;5'UTR;20;-121;92;22
	5'-GC**G**GC**G**GCGGCGGCGGCG**G**CGGC-3'
	  ||**|**||**|** ||||||||||**|** |||
	3'-CG**U**CG**U**CUCCGCCGCCGC**U**-CCG-5'

ID01310.3p-miR;5'UTR;23;-121;92;22
5'-GC**G**GC**G**GCGGCGGCGGCG**G**CGGC-3'
  ||**|**||**|** ||||||||||**|** |||
3'-CG**U**CG**U**CUCCGCCGCCGC**U**-CCG-5'
	ID01310.3p-miR;5'UTR;26;-121;92;22
	5'-GC**G**GC**G**GCGGCGGCGGCG**G**CGGC-3'
	  ||**|**||**|** ||||||||||**|** |||
	3'-CG**U**CG**U**CUCCGCCGCCGC**U**-CCG-5'

ID02761.3p-miR;5'UTR;28;-138;93;24
5'-GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCC**GG**G-3'
  ||||||||||||||| ||| ||**|||**
3'-CCGCCGCCGCCGCCGGCGC-GG**UU**C-5'
	miR-1908-3p;5'UTR;30;-121;92;21
	5'-CGGCGGCGGCGGCGGCGGCCGG-3'
	  ||| ||||| | ||||||||||
	3'-GCC-CCGCCUCGGCCGCCGGCC-5'

ID00278.3p-miR;5'UTR;32;-125;91;23
5'-G**C**GGC**G**GCGGCGGCGGCCGGGAG**A**-3'
  |**||** **|**||||||||||| |||||**|**
3'-C**A**CC-**U**CGCCGCCGCCGUCCCUC**C**-5'
	ID02430.3p-miR;5'UTR;34;-110;98;18
	5'-GGCGGCGGCGGCGGCCG**G**G-3'
	  ||||||||||||| ||||**|**
	3'-CCGCCGCCGCCGC-GGC**U**C-5'

*Примечание: miRNA; участок mRNA; начало сайта (нт); свободная энергия, ΔG (кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт); жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U-G, A-C.	

Пять miRNA с перекрывающимися сайтами связывания были обнаружены в 5'UTR mRNA *MMP2* гена с длиной кластера 39 нт. Общая длина miRNA составляет 114 нт, что в 2,9 раза больше, чем общая длина кластера. Средняя свободная энергия взаимодействия пяти miRNA с mRNA гена *MMP2* составила -122 кДж/моль.

Ген *RAB5A* был мишенью для шести miRNA, сайты связывания которых были сформированы в два кластера. Длина кластера сайтов связывания для TJU_CMC_MD2.ID02930.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01859.5p-miR, расположенного от 184 до 204 нт, составляла 31 нт. Общая длина сайтов связывания этих miRNA, расположенных последовательно, составила 71 нт. Следовательно, из-за перекрытия нуклеотидных последовательностей сайтов связывания этих miRNA общая длина сайтов связывания уменьшилась в 2,3 раза. Однако в то же время только одна miRNA может взаимодействовать с mRNA в сегменте 31 нт. Таким образом, существует конкуренция между тремя miRNA за связывание с mRNA гена-мишени. Более вероятно, что miRNA будет связываться с большей свободной энергией взаимодействия с mRNA в равных концентрациях или с miRNA, которая присутствует в большей концентрации при равной свободной энергии взаимодействия с mRNA. Второй кластер сайтов связывания miRNA был расположен от 325 нт до 356 нт и имел длину 32 нт. Общая длина сайтов связывания miRNA была в 2,1 раза больше длины кластера.

В результате шесть сайтов связывания длиной 138 нт были компактизованы в кластеры длиной 63 нт. Эта длина значительно меньше общей длины (535 нт) 5'UTR mRNA *RAB5A* гена. Средняя свободная энергия взаимодействия шести miRNA с mRNA *RAB5A* составила -128 кДж/моль. Ассоциации между этими miRNA с соответствующими генами-мишенями рекомендуются в качестве маркеров для диагностики субтипа triple-negative рака молочной железы. В таблице 50 показаны схемы взаимодействия некоторых miRNA с mRNA нескольких генов-кандидатов субтипа triple-negative. В 3'UTR mRNA было шесть генов-кандидатов, которые образовали кластер (таблица 48). Было шесть сайтов связывания miRNA, которые образовывали два кластера сайтов связывания в mRNA гена *ATM*. Первый кластер длиной 37 нт начинался с 9778 нт, а второй кластер длиной 42 нт начинался с 11054 нт. Общая длина miRNA для первого и второго кластеров составила 67 нт и 68 нт соответственно. Уменьшение общей длины сайтов связывания miRNA при перекрывании их нуклеотидных последовательностей в кластерах составило 1,6 - 1,8 раза. Средняя свободная энергия взаимодействия шести miRNA с mRNA гена *ATM* составила -115 кДж/моль.

Кластер сайтов связывания в mRNA гена *IL11* расположен от 1466 нт до 1497 нт длиной 31 нт. Сумма длин сайтов связывания, равная 89 нт, в 2,9 раза больше длины кластера. Кластеры сайтов связывания для трех miRNA были идентифицированы в 3'UTR mRNA генов *RUNX1* и *CBL*.

Таблица 50 - Схемы взаимодействия miRNA с mRNA субтипа triple-negative рака молочной железы [283, с. 20-26; 284, с. 13].

CBL;ID01810.3p-miR; 5'UTR;31;-113;87;23 5'-GGC**G**GCGG**C**GG**CG**GC**G**GC**C**GGGA-3' 3'-CCG**U**CGCC**A**CC**AU**CG**U**CG**A**CCAU-5'	*RAB5A*; ID03229.5p-miR; 5'UTR;327;-115;86;22 5'-G**GC**G**AC**GCCGCCGCCGCC**A**CC**A**-3' 3'-C**UA**C**CA**CGGCGGCGGCGG**C**GG**C**-5'
RUNX1; ID01321.5p-miR; 5'UTR;1436;-110;90;21 5'-CCCGCCC**CC**CC**C**CA**C**CCCCCG-3' 3'-GGGCGGG**AA**GG**A**GA**A**GGGGGC-5'	*CBL*;miR-3198;CDS;1589;-106;88;22 5'-UCUCCAUUC**U**CCAUG**G**C**C**CCAC-3' 3'-AGAGGUAAG**G**GGUCC**U**G**A**GGUG-5'
ATM;miR-5095;3'UTR;9787;-108;93;21 5'-CGC**A**G**C**GG**C**UCACGCCUGUAA-3' 3'-GCG**C**C**A**CC**A**AGUGCGGACAUU-5'	*ATM*;miR-619-5p;3'UTR;9793;-119;98;22 5'-GCCUG**G**CCA**GU**AUGGUGAAAC-3' 3'-CGGAC**U**GGU**UG**UACCACUUUG-5'
ATM;miR-5096;3'UTR;9882;-104;92;21 5'-GCCUG**G**CCA**GU**AUGGUGAAAC-3' 3'-CGGAC**U**GGU**UG**UACCACUUUG-5'	*ATM*;miR-1273a;3'UTR;11054;-119;90;25 5'-**G**AGACAGAGUCUUGCU**C**UGUC**A**CCC-3' 3'-**U**UCUUUCUCAGAACGA**A**ACAG**C**GGG-5'
ATM;miR-1273g-3p;3'UTR;11076;-113;96;21 5'-C**C**CAGGCUGGAGUGCAGUGG**C**-3' 3'-G**A**GUCCGACCUCACGUCACC**A**-5'	*ATM*;miR-1273e;3'UTR;11119;-108;93;22 5'-UC**UG**C**C**UCCUGGGUUCAAGCAA-3' 3'-AG**GU**G**A**AGGACCCAAGUUCGUU-5'
CBL;miR-1273a;3'UTR;7727;-117;89;25 5'-**G**AGAU**G**GAGUCU**C**GCUGUGUCGCCC-3' 3'-**U**UCUU**U**CUCAGA**A**CGAAACAGCGGG-5'	*CBL*;miR-566;3'UTR;7838;-98;90;19 5'-G**C**UGGGAU**U**ACAGGCGCC**U**-3' 3'-C**A**ACCCUA**G**UGUCCGCGG**G**-5'
CBL;miR-3155a;3'UTR;10588;-106;91;21 5'-AGUGCCCUCUGCAG**G**GCCUGG-3' 3'-UCAAGGGUGACGUC**U**CGGACC-5'	*IL11*;miR-1273f;3'UTR;1466;-102;98;19 5'-CACUGCAACCUCCA**C**CUCC-3' 3'-GUGACGUUGGAGGU**A**GAGG-5'
IL11;miR-1273d;3'UTR;1467;-121;89;25 5'-ACUGCA**A**CCUCCACCUCC**C**GGGUUC-3' 3'-UGACGU**C**GGAGUUGGAGU**A**CCCAAG-5'	*IL11*;miR-1273e;3'UTR;1476;-113;96;22 5'-UCCAC**C**UCC**C**GGGUUCAAGCAA-3' 3'-AGGUG**A**AGG**A**CCCAAGUUCGUU-5'
IL11; ID01404.5p-miR;3'UTR; 1476;-113;91;23 5'-GCAA**C**CUC**C**ACCUC**C**GGGUUCA-3' 3'-CGUU**A**GAG**A**AGGAG**A**GCCCAAGU-5'	*IL11*;miR-5095;3'UTR;1982;-106;91;21 5'-C**AU**GGUGG**C**UCACGCCUGUAA-3' 3'-G**CG**CCACC**A**AGUGCGGACAUU-5'
RUNX1; ID00436.3p-miR; 3'UTR;5464;-108;93;23 5'-GUGUGUGCGU**G**U**G**U**G**UGUGUGU**G**-3' 3'-CACACACGCA**U**A**U**A**U**ACACACA**U**-5'	*STMN1*;miR-1273a;1729;3'UTR;-115;87;25 5'-**G**AG**G**CAGAGUCU**CA**CUCUGUCGCCC-3' 3'-**U**UC**U**UUCUCAGA**AC**GAAACAGCGGG-5'
STMN1;miR-1273c;1731;3'UTR;-106;88;22 5'-G**G**CAG**A**GUCUC**AC**U**C**UGUCGCC-3' 3'-C**U**GUC**C**CAGAG**CA**A**A**ACAGCGG-5'	*STMN1*;miR-1273-3p;1751;3'UTR;-103;93;21 5'-C**C**CAGGCUGGAGGGCAGUGG**C**-3' 3'-G**A**GUCCGACCUCACGUCACC**A**-5'

Продолжение таблицы 50

STMN1;miR-1285-3p;1735;3'UTR;-104;89;22 5'-**GA**GUCUCACU**C**UGU**C**GCCCAG**G**-3' **||**||||||||**|**||||||**| 3'-**UC**CAGAGUGA**A**ACA**A**CGGGUC**U**-5'	*STMN1*;miR-5585-3p;1831;3'UTR;-106;91;22 5'-CUC**C**CGAGUAGCUGGGACUACA-3' |||**|**|||||||||| ||| || 3'-GAG**A**GCUCAUCGACCAUGAAGU-5'
SFN; ID00436.3p-miR;3'UTR; 1190;-104;89;23 5'-GUGUGUG**U**GU**G**U**G**U**G**UGUGUGU**G**-3' |||||||**|**||**|**||**|**||||||||**|** 3'-CACACAC**G**CA**U**A**U**AUACACACA**U**-5'	*SFN*; ID00436.3p-miR; 3'UTR;1202;-104;89;23 5'-GUGUGUG**U**GU**G**U**G**U**G**UGUGUGU**G**-3' |||||||**|**||**|**||**|**||||||||**|** 3'-CACACAC**G**CA**U**A**U**A**U**ACACACA**U**-5'
SFN;ID01727.5p-miR;3'UTR; 1203;-106;91;23 5'-UGUGUGUGUGUGUGU**G**UGUGUGC-3' ||||||| ||| |||**|**||||||| 3'-ACACACAAACAAACA**U**ACACACG-5'	*SFN*;ID02868.3p-miR; 3'UTR;1188;-113;90;23 5'-**G**GGUGUGUGUGUGUGUGUGU**U**G-3' **|**||||| ||||||||||||**||** 3'-**U**CCACAGACACACACACACAC**G**C-5'
*Примечание: Ген; miRNA; участок mRNA; начало сайта связывания (нт); свободная энергия, ΔG (кДж/моль); ΔG/ΔGm (%); длина miRNA (нт). Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U-G, A-C.	

В 3'UTR mRNA гена *CBL* кластер из трех сайтов связывания miRNA имел длину 44 нт, а общая длина сайтов связывания составляла 70 нт. В 3'UTR mRNA гена *RUNX1* кластер из трех сайтов связывания miRNA имел длину 34 нт, а сумма длин пяти сайтов связывания составляла 115 нт. Компактизация длины сайтов связывания этих miRNA привела к появлению конкуренции между ними за сайт связывания в mRNA. Средняя свободная энергия взаимодействия miRNA с mRNA в кластерах генов *CBL* и *RUNX1* составила -116 кДж/моль и -109 кДж/моль, соответственно. Было два кластера сайтов связывания для трех miRNA в 36 нт в области от 826 нт до 861 нт и еще один кластер в 53 нт от 1179 нт до 1231 нт в 3'UTR mRNA гена *SFN*. Третий кластер включал 21 сайт связывания пяти miRNA. Сумма длин всех сайтов связывания miRNA двух кластеров составила 619 нт.

Из-за кластеризации сайтов связывания этих miRNA фактический сайт связывания составлял всего 89 нт, что в семь раз меньше и составляет 18% от длины 3'UTR mRNA гена *SFN*, равного 498 нт. Средняя свободная энергия связывания miRNA в 27 сайтах составляла -108 кДж/моль.

Ген *STMN1* был мишенью для четырех miRNA, сайты связывания которых в 3'UTR занимали 43 нт, тогда как общая длина miRNA составляла 90 нт. Средняя свободная энергия связывания miRNA в четырех сайтах составляла -110 кДж/моль.

Значение свободной энергии было выше, чем -125 кДж/моль для взаимодействий TJU_CMC_MD2.ID03332.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID02430.3p-miR TJU_CMC_MD2.ID02761.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID00278.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID03345.5p-miR, TJU_CMC_MD2.ID02930.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID03445.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01804.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID00061.3p-miR,

TJU_CMC_MD2.ID03006.5p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01774.5p-miR miR-1273d, miR-6089 и с mRNA генов *CBL, MMP2, RAB5A, ATM, IL11* и *SFN*.

Ген *CBL* ассоциативно связан с шестью miRNA в 5'UTR и с тремя miRNA в 3'UTR, ген *MMP2* с пятью miRNA, ген *RAB5A* с шестью, ген *ATM* с шестью, ген *SOX4, IL11* и *STMN1* с четырьмя, ген *TGFB1* с семью miRNA, ген *RUNX1* с тремя miRNA, ген *SFN* с 11 miRNA. Таким образом, для разработки методов диагностики рака молочной железы субтипа triple-negative рекомендуется использовать все 11 ассоциаций генов.

В связи с обнаружением кластеров сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов субтипов РМЖ возникает вопрос о том, насколько устойчивы эти структурные формы. Известно, что некоторые miRNA возникли на ранних этапах эволюции и устойчивы на протяжении десятков миллионов лет дивергенции видов [266, с. 438-444]. Другие связи miRNA с mRNA появились недавно, и они не наблюдаются даже у близкородственных видов. В связи с этим была проведена проверка вариабельности нуклеотидных последовательностей сайтов связывания в выявленных кластерах. В таблицах 51-53 приведены результаты анализа нуклеотидных последовательностей кластеров в mRNA кандидатных генов субтипов РМЖ. Полученные данные показывают, что в большинстве случаев нуклеотидные последовательности кластеров идентичны. Наблюдаемые различия в единичных нуклеотидах незначительно изменяют степень взаимодействия miRNA с сайтами связывания. Следовательно, установленные взаимодействия miRNA с сайтами связывания, организованными в кластерах, стабильны в геномах изучаемых объектов, которые дивергировали в течение миллионов лет. Эволюционный консерватизм ассоциаций miRNA и mRNA позволяет выбрать адекватные модели животных для изучения ассоциаций miRNA и mRNA генов.

Таблица 51 - Нуклеотидные последовательности кластеров сайтов связывания miRNA в ортологичных кандидатных генах субтипа HER2 [282, с. 343-345; 283, с. 20-26; 284, с. 13].

Ген	Нуклеотидная последовательность кластера	Объекты
1	2	3
EPOR	gccgggggcgggggacggaggggcag gccaggggcgggggacggaggggcag gccaggggcgggggacagaggggcag gccaggggcgggggacggaggggcag gccaggggcgggggacagaggggcag gccaggggcgggggacggaggggcag gccaggggcgggggacggaggggcag	*Hsa* *Ptr* *Mml* *Ggo* *Pan* *Ppa* *Pab*
MAZ	ggccggggugcgcgggcggcggggcggcccgcgg ggccggggugcgcgggcggcggggcggcccgcgg ggccggggugcgcgggcggcggggcggcccgcgg	*Hsa* *Ptr* *Pab*
MAZ	cgccccgagcccgggccccgcgcggcccgcgcccccggcccccg cgccccgagcccgggccccgcgcggccagcgcccccggcccccg cgccccgagcccgggccccgcgcggcccgcgcccccggcccccg	*Hsa* *Ptr* *Pab*

Продолжение таблицы 51

1	2	3
*MAZ**	gccgcgccggcgcccccgcccacgccccaggcc gccgcgccggcgcccccgcccacgccccaggcc gccgcgccagcgcccccgcccacgccccaggcc	*Hsa* *Ptr* *Pab*
*MAZ**	gcggcugcugcggccgcugccgccgcugcugccgccgucgcugccg cgccccggccccugccgccgccucua gcggcugcugcggccgcugccgccgcugcugccgccgucgcugccg cgccccggccccugcugccgccucca gcggcugcugcggccgcugccgccgcugcugccgccgucgcugccg cgccccggccccugccgccgccucca	*Hsa* *Ptr* *Pab*
*MAZ**	aggccgcgccccccgccuccgccgcca aggccgcgccccccgccuccgccgcca aggccgcgccccccgccuccgccgcca	*Hsa* *Ptr* *Pab*
*MAZ**	gcggagccggcgggggaggggagaggcgg gcggagccggcgggggaggggagaggcgg gcggagccggcgggggaggggagaggcgg	*Hsa* *Ptr* *Pab*
NISCH	ggcgggggcgacgggcggcgggggccgggggcg ggcgggggcgucgggcggcgggggcugggggcg ggcgggggcgaggagcggcgggggcugcggggcg ggcgggggcgugggggcggcgggggcugggaggcg ggcgggggcgugggggcggcgggggcugggggcg ggcgggggcgucgggcggcgggggcugggggcgg	*Hsa* *Ptr* *Pab* *Ggo* *Pan* *Ppa*
*MAPK3**	ccaauaaacggaucacaguggagg ccaauaaacggaucacaguggagg ccaauaaacggaucacaguggagg ccaauaaacggaucacaguggagg	*Hsa* *Ptr* *Ggo* *Pab*
*BRCA2***	aaaacaucuuuggcugagcucgguggcucaugccuguaaucccaac aaaacaucuuuggcugagcucgguggcucaugccuguaaucccaac aaaacaucuuuggcugagcucgguggcucaugccuguaaucccaac aaaacaucuuuggcugagcucaguggcucaugccuguaaucccaac	*Hsa* *Ppa* *Ggo* *Pab*
*CDK6***	ugcaagagugauugcagcuuuauguucauuugu ugcaagagugauugcagcuuuauguucauuugu ugcaagagugauugcagcuuuauguucauuugu ugcaagagugauugcagcuuuauguucauuugu	*Hsa* *Ptr* *Pab* *Ppa*
*CDK6***	ugugugugugcaugugugugugugugugugugugugugugugua ugugag ugugugcgugugugugugugugugugugugugugugugua ugugag	*Hsa* *Ptr*
*Примечание. Ген без * - сайты связывания в 5'UTR, гены со * - сайты связывания miRNA в CDS, ** - сайты связывания miRNA в 3'UTR.		

Таблица 52 - Нуклеотидные последовательности кластеров сайтов связывания miRNA в ортологичных кандидатных генах субтипов luminal A и B [283, с. 20-26; 284, с. 13; 285, с. 1-4].

Ген	Нуклеотидная последовательность кластера	Объекты
1	2	3
FOXA1	cccccggcgcugcccccgcccgccgcgccgccgccgccgcgca cgccgc	*Hsa*

Продолжение таблицы 52

1	2	3
	ccccggcgcugccccucccgccgcgccgcgccgccgccgcg cacgcc	*Mml*
	uccccggcgcugccccucccgccgcgccgcgccgccgccgcg cacgcc	*Mmu*
HMGA2	cccaccgccgccgccgccaccggcagcgccuccuccucuccuccuc cuccucccccucu	*Hsa*
	cccaccgccgccgccgccaccggcagcgccuccuccucuccuccuc cuccucccccucu	*Ptr*
	gccgccgccgccgccgccaccggcagcgccuccuccucuccuccuc cuccucccccucu	*Pan*
	gccgccgccgccgccgccaccggcagcgccuccucccccuccuccuc cuccucccccucu	*Pab*
	gccgccgccgccgcagccaccggcagcgccuccuccuccucuccuc cuccuccucccccu	*Mml*
*HMGA2***	uggggugggguggggugggggaggg-ggggguggggugggggagaa	*Hsa*
	uggggugggguggggugggggaggg-ggggguggggugggggagaa	*Ptr*
	uggggugggguggggcgggggagggugggggugggggugggggagaa	*Mml*
	ugggguggg-uggggugugggagggugggggugggggugggggagaa	*Pab*
*ITGB1**	ggaggagccgccgccacccgccgcgcccga	*Hsa*
	ggaggagccgccgccacccgccgcgcccga	*Mml*
	ggaggagccgccgccacccgccgcgcccga	*Ptr*
	ggaggagccgccgccacccgccgcgcccga	*Pan*
*SMAD3***	cccagcccagccccgccccgccccgcccc	*Hsa*
	cccagcccggcccagccccgccccgcccc	*Ptr*
	cccagcccggcccagccccgccccgcccc	*Ppa*
	cccagcccagccccagcacuccagcagacc	*Pan*
	cccagcccagccccaccacuccagcagacc	*Pab*
	cccagccccgccccaccacuccagcagacc	*Ggo*
*SOX4***	agcgggagcuaggggcgggggcggaggag	*Hsa*
	agcgggagcuaggggcgggggcggagaag	*Pab*
	agcgggagcuaggggcgggggcggagaag	*Ptr*
	agcgggagcuaggggcgggggcggagaag	*Pan*
*TGFB1***	ccgccccgccccgccccgccccggcaggcccggccccaccccgccc cgcccccgcugc	*Hsa*
	ccgccccgccccgccccaccccggcaggcccggccccgccccgccc cgcccccgcugc	*Pan*
	ccgccccgccccgccccgccccggcaggcccggccccaccccgccc ccgcugccuugc	*Ptr*
	ccgccccgccccgccccgccccggcaggcccggccccaccccgccc cgcccugccccc	*Pab*
	ccgccccgccccgccccu_cccggcaggcccggccccgcccccgcc ccgcccgcagc	*Mmu*
*Примечание. Ген без * - сайты связывания в 5'UTR, гены со * - сайты связывания miRNA в CDS, ** - сайты связывания miRNA в 3'UTR.		

Таблица 53 - Нуклеотидные последовательности кластеров сайтов связывания miRNA в ортологичных кандидатных генах субтипа triple-negative [283, с. 20-26; 284, с. 13].

Ген	Нуклеотидная последовательность кластера	Объект
1	2	3
CBL	ggcggcggcggcggcggcggcggcggcggccgggag	*Hsa*
	gcccggauagccggcggcggcggcggcggccgggag	*Ptr*
	gcccggauagccggcggcggcggcggcggccgggag	*Ggo*
	gcccggauagccggcggcggcggcggcggccgggaggag	*Pan*
*CBL***	gagauggagucucgcugugucgcccaggcuggag	*Hsa*
	gagacggagucucgcugugucgcccaggcuggag	*Ggo*
	gagacagagucucgcugugucgcccaggcuggag	*Ptr*
	gagacagagucucgcugugucgcccaggcuggag	*Ppa*
	gagaaggagucuugcugugucaccuaggcuggag	*Pan*
MMP2	gcggcggcggcggcggcggcgggggcuggggcgcgggg	*Hsa*
	gcggcggcggcggcggcggcgggggcuggggagcgggg	*Pab*
	gcggcggcggcggcggcggcgggggcuggggcgcggag	*Ggo*
	gcggcggcggcggcggcggcgggggcuggggcgcgggc	*Ptr*
	gcggcggcggcggcggcggcagcgggggcgcgggggcc	*Mml*
	gcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgggggcgcg	*Pan*
RAB5A	ggcggcggaggaggagaaaggaaagaggaa	*Hsa*
	ggcggcggaggaggagaaaggaaagaggaa	*Ptr*
	ugcggcggaggaggggaaaggaaagaggaa	*Mml*
	ggcggcggaggaggagaaaggaaagaggaa	*Pab*
	ucuggaggaggaggagaaaggaaggcggaa	*Mmu*
RAB5A	gccaccaccaccgccauagauacacuc	*Hsa*
	gccaccaccaccgccauagauacacuc	*Ptr*
	gccaccaccaccgccauagauacacuc	*Pab*
	gccaccaccaccgccauagacacacac	*Mml*
*ATM***	cgggcugggcgcagcggcucacgccuguaaucccagc	*Hsa*
	ugggcugggcgcagcagcucacgccuguaaucccagc	*Pab*
	cgggcugggcgcagcggcucacgccuguaaucccagc	*Ptr*
	cgggcuggauacagcagcucacgccuguaaucccggc	*Pan*
	cgggcugggcgcagcggcucacgccuguaaucccagc	*Ppa*
*ATM***	uaaugagacagagucuugcucugucacccaggcuggagugcaguggc	*Hsa*
	uaaugagacagagucuugcucugucacccaggcuggagugcaguggc	*Ptr*
	aguagagacagaguuucaccguguuagccaggauggucucgaucgcu	*Ppa*
	aguagagacagaguuucaccguguuagccaggauggucucgaucgcu	*Pan*
	aguagagacugaguuucaccguguuagccaggauggucuccaucgcc	*Pab*
*IL11***	cacugcaaccuccaccucccggguucaagcaa	*Hsa*
	cacugcaaccuccaccucccggguucaagcaa	*Ptr*
	cacugcaaccuccaccucccggguucaagcaa	*Ppa*
*RUNX1***	guaugugugugugugugcgugugugugugugug	*Hsa*
	gugugugugugugugcgugugugugugugugug	*Ptr*
	gugugugugugugugugugugugguaugugugug	*Mml*
	uuuugugugugugugugugugugugugagag	*Pan*
*SFN***	ccgccaccgccccgcccugccccuuccagucccc	*Ptr*
	ccgccaccgccccgcccugcccccuccagucccc	*Hsa*
	ccgccaccgccccgcccugcccccuccagucccc	*Ggo*
	ccgccaccgccccgcccugcccccuccagucccc	*Ppa*

Продолжение таблицы 53

1	2	3
*SFN***	gcuggagaugggugugugugugugugugugugugugugugugugcgcgcg gcuggagaugggugugugugugugugugugugugugugugugugugacag gcuggagaugggugugugugugugugugugugagugugugcgcgcgcgcg	*Hsa* *Ptr* *Ppa*
*STMN1***	gaggcagagucucacucugucgcccaggcuggagggcagugg gaggcagagucucacucugucgcccaggcuggagggcagugg	*Hsa* *Ppa*
*Примечание. Ген без * - сайты связывания в 5'UTR, гены со * - сайты связывания miRNA в CDS, ** - сайты связывания miRNA в 3'UTR.		

Полученные данные показывают, что в большинстве случаев нуклеотидные последовательности кластеров идентичны. Наблюдаемые отличия единичных нуклеотидов слабо изменяют степень взаимодействия miRNA с сайтами связывания. Следовательно, сложившиеся связи между miRNA и сайтами связывания, организованными в кластеры, являются устойчивыми в геномах изученных объектов дивергировавших многие миллионы лет.

Этот результат позволяет считать кластеры как устойчивые образования и на этой основе можно разрабатывать методы диагностики и терапии заболеваний.

3.9 Взаимодействия miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* генов

mRNA генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* и ассоциированных miR-5p/miR-3p транскрибируются с противоположных комплементарных цепей DNA [286, 287]. Их транскрипция и дальнейший процессинг pre-mRNA и pri-miRNA происходят независимо друг от друга. Следовательно, концентрации mRNA, miR-5p/miR-3p могут значительно различаться, что отразится на вероятности их взаимодействия. Представлены характеристики полностью комплементарного взаимодействия этих miRNA и mRNA генов *CCDC42B, FOXF2, GLYCTK, KIAA2026, PLPPR3* (таблица 54).

Таблица 54 - Характеристики взаимодействий miRNA-5p и miRNA-3p, с mRNA *CCDC42B, FOXF2, GLYCTK, KIAA2026, PLPPR3* ассоциированных генов человека [288-290].

Гены	miRNA	Начало сайтов, нт	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
1	2	3	4	5	6
CCDC42B	miR-7106-3p	1350*	-127	100	23
CCDC42B	miR-7106-5p	1390*	-113	100	20
FOXF2	miR-6720-3p	491	-134	100	22
FOXF2	miR-6720-5p	526	-123	100	23

Продолжение таблицы 54

1	2	3	4	5	6
GLYCTK	miR-135a-3p	2773*	-121	100	22
GLYCTK	miR-135a-5p	2811*	-113	100	23
KIAA2026	miR-4665-3p	107**	-159	100	26
KIAA2026	miR-4665-5p	146**	-136	100	23
PLPPR3	miR-3187-3p	1229	-117	100	20
PLPPR3	miR-3187-5p	1263	-132	100	23
*Примечание. * - 3'UTR, ** - 5'UTR, без * - CDS					

Взаимодействие miR-6720-5p и miR-6720-3p с mRNA FOXF2

Сайты связывания пар miRNA-3p и miRNA-5p были обнаружены в 5'UTR, 3'UTR и CDS mRNA генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK и CCDC42B*. Сайты связывания для miR-6720-3p и miR-6720-5p были выявлены в CDS mRNA *FOXF2*. Свободная энергия взаимодействия miR-6720-5p и miR-6720-3p с mRNA *FOXF2* составляла -134 кДж/моль и -123 кДж/моль, соответственно (таблица 54). Сайты связывания для miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют три пары олигопептидов, которые консервативны в каждой из трех групп mRNA 34 видов животных (таблица 55). Данные в таблице 55 демонстрируют, что аминокислоты олигопептидов IYQFLQAR и RGAYQGWK белка FOXF2 консервативны у 15 видов животных (таблица 55, A). В другой группе животных сайты связывания miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют олигопептиды IYQFLQSR и RGSYQGWK (таблица 55, B). В третьей группе животных сайты связывания miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют олигопептиды IYQSLQAR и RGAYQGWK (таблица 55, C).

Таблица 55 - Диаграммы Logo, демонстрирующие вариабельность аминокислот в областях ортологичных белков FOXF2, содержащих олигопептиды, кодируемые сайтами связывания miR-6720-3p (синий цвет) и miR-6720-5p (красный цвет): IYQFLQAR и RGAYQGWK (A), IYQFLQSR и RGSYQGWK (B), IYQSLQAR и RGAYQGWK (C) [288, с. 612-623; 289, с. 692-704; 290, с. 6-7]

A	
	Hsa, Ame, Cfa, Cja, Csa, Laf, Mfa, Mml, Ocu, Pal, Ptr, Rro, Chi, Lve, Ssc
B	
	Bac, Cfe, Eca, Oar, Pab, Pho,Pti, Sbo, Uma
C	
	Cgr, Fca,Hgl, Mbr, Mda, Mdo, Mmu, Nga, Rno, Tch

Таким образом, взаимодействие между miRNA и mRNA 34 генов было установлено более десятков миллионов лет назад и сохранялось при дивергенции исследуемых видов животных. Нуклеотидные последовательности между сайтами связывания miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют консервативный тетрапептид FPFF как и прилегающий олигопептид NSVRHNLSLNECF.

Характеристики сайтов связывания для miR-6720-5p и miR-6720-3p были определены для семи mRNA генов-мишеней, участвующих при раке молочной железы, раке толстой кишки, раке поджелудочной железы и раке щитовидной железы. Сайты связывания этих miRNA расположены только в CDS, а свободная энергия связывания находится в диапазоне от -110 кДж/моль до -121 кДж/моль (таблица 56).

Таблица 56 - Характеристики взаимодействия miR-5p/miR-3p (ассоциированных с генами *CCDC42B, FOXF2, GLYCTK, KIAA2026, PLPPR3*) с mRNA генов-мишеней [288, с. 612-623; 289, с. 692-704; 290, с. 6-7].

miRNA (ассоциированный ген)	Ген	Начало сайта, нт	Участок mRNA	ΔG, кДж/моль	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт
miR-7106-5p(*CCDC42B*)	*DDX20*	304	5'UTR	-104	92	20
miR-7106-5p(*CCDC42B*)	*KIRREL*	314	5'UTR	-104	92	20
miR-7106-5p(*CCDC42B*)	*MAML1*	4045	3'UTR	-106	94	20
miR-7106-5p(*CCDC42B*)	*MAPKAPK2*	2892	3'UTR	-104	92	20
miR-7106-5p(*CCDC42B*)	*MAPT*	1007	CDS	-106	94	20
miR-7106-5p (*CCDC42B*)	*SBK1*	2495	3'UTR	-106	94	20
miR-7106-5p(*CCDC42B*)	*TEAD2*	1460	3'UTR	-104	92	20
miR-7106-3p(*CCDC42B*)	*FAM213B*	86	CDS	-115	90	23
miR-7106-3p(*CCDC42B*)	*FANCG*	831	CDS	-115	90	23
miR-7106-3p(*CCDC42B*)	*GMEB2*	2965	3'UTR	-115	90	23
miR-6720-5p(*FOXF2*)	*CPAMD8*	148	CDS	-121	90	23
miR-6720-5p(*FOXF2*)	*FOXF1*	298	CDS	-121	90	23
miR-6720-3p(*FOXF2*)	*ACTN2*	958	CDS	-110	90	22
miR-6720-3p(*FOXF2*)	*B3GNT1*	176	CDS	-110	90	22
miR-6720-3p(*FOXF2*)	*EVPL*	2656	CDS	-113	91	22
miR-6720-3p(*FOXF2*)	*SLC25A29*	568	CDS	-115	93	22
miR-6720-3p(*FOXF2*)	*ZNF653*	1821	CDS	-110	90	22
miR-135a-5p (*GLYCTK*)	*FHL5*	2659	3'UTR	-104	92	23
miR-135a-3p(*GLYCTK*)	*ILDR1*	1688	CDS	-110	91	22
miR-4665-5p(*KIAA2026*)	*EFEMP1*	266	5'UTR	-123	91	23
miR-4665-5p(*KIAA2026*)	*ZFP36L2*	1610	CDS	-123	91	23
miR-3187-5p(*PLPPR3*)	*ITGA1*	57	CDS	-119	90	23
miR-3187-5p(*PLPPR3*)	*OGDH*	3408	3'UTR	-125	95	23
miR-3187-5p (*PLPPR3*)	*PELO*	419	5'UTR	-119	90	23
miR-3187-3p(*PLPPR3*)	*CNGB1*	1717	CDS	-106	91	20
miR-3187-3p(*PLPPR3*)	*DENND4B*	3667	CDS	-108	93	20
miR-3187-3p(*PLPPR3*)	*SMARCA4*	684	CDS	-108	93	20

Взаимодействие miR-3187-5p и miR-3187-3p в mRNA PLPPR3

Сайты связывания для miR-3187-5p и miR-3187-3p были обнаружены в CDS mRNA *PLPPR3*. Для miR-3187-5p с длиной 23 нт и miR-3187-3p с длиной 20 нт энергии взаимодействия с mRNA составляли -132 кДж/моль и -117 кДж/моль, соответственно. Олигопептиды, кодируемые сайтами связывания для miR-3187-5p и miR-3187-3p, тоже консервативны в mRNA *PLPPR3* у 37 видов животных (таблица 57). Ортологичные белки PLPPR3, содержащие олигопептиды PRSPMAK и TFSHTLPR, кодировались сайтами связывания miR-3187-5p и miR-3187-3p. Однако фланкирующие аминокислоты были вариабельными (таблица 57, C).

Таблица 57 - Диаграммы Logo, демонстрирующие вариабельность аминокислот в областях ортологичных белков PLPPR3, содержащих олигопептиды, кодируемые miR-3187-3p (синий цвет) и miR-3187-5p (красный цвет), PRSPMAK и TFSHTLPR (A), олигопептиды PRSPMGK и TFSHTLPR (B) и олигопептиды PRSPMGK и TFSHTLPR (C) [288, с. 612-623; 289, с. 692-704; 290, с. 6-7].

A	
	Hsa, Csa, Mfa, Nle, Ptr, Rro, Sbo
B	
	Ame, Bac, Bmu, Bta, Chi, Fca, Lve, Mbr, Mda, Oar, Pal, Pho, Ssc
C	
	Aca, Ami, Asi, Laf, Mdo, Cfe, Ocu, Pti, Uma, Cgr, Mmu, Ggo, Hgl, Tch, Nga, Pab, Rno

Для miR-3187-5p и miR-3187-3p, ассоциированных с геном *PLPPR3*, шесть сайтов связывания были обнаружены в генах-мишенях, участвующих при раке молочной железы, колоректальном раке, спорадической аденоме гипофиза, раке желудка и раке яичника (таблица 56). Сайты связывания расположены в 5'UTR, 3'UTR и CDS, и их свободная энергия взаимодействия варьировала от -106 кДж/моль до -125 кДж/моль.

Взаимодействие miR-4665-5p и miR-4665-3p в mRNA KIAA2026

Сайты связывания для miR-4665-5p и miR-4665-3p были установлены в 5'UTR mRNA *KIAA2026* (таблица 58). Для miR-4665-3p с длиной 26 нт энергия взаимодействия с mRNA гена *KIAA2026* видов *H. sapiens*, *P. troglodytes* и *P. paniscus* составляет -159 кДж/моль, а для miR-4665-5p с

длиной 23 нт, энергия взаимодействия с mRNA гена *KIAA2026* составляет -136 кДж/моль (таблица 58).

Таблица 58 - Схемы взаимодействий miR-4665-3p и miR-4665-5p с 5'UTR mRNA ортологичных генов *KIAA2026* [288, с. 612-623; 289, с. 692-704; 290, с. 6-7].

Объект, характеристики связывания	miR-4665-3p
Hsa, Ptr, Ppa: -159 кДж/моль, 100%, 26 нт	mRNA 5'-GGCGGGGGCUACGCGCCGCGGCCGAG-3' |||||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-CCGCCCCCGAUGCGCGGCGCCGGCUC-5'
Ggo: -155 кДж/моль, 97%, 26 нт	mRNA 5'-GG**U**GGGGGCUACGCGCCGCGGCCGAG-3' |||||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-CC**G**CCCCCGAUGCGCGGCGCCGGCUC-5'
Csa, Mfa, Mml, Nle, Pan, Rro: -155 кДж/моль, 97%, 26 нт	mRNA 5'-GGC**A**GGGGCUACGCGCCGCGGCCGAG-3' |||||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-CCG**C**CCCCGAUGCGCGGCGCCGGCUC-5'
Объект, характеристики связывания	miR-4665-5p
Hsa, Ptr,Ppa, Ggo, Mfa, Mml, Mne, Nle,Pan, Rbi, Rro: -136 кДж/моль, 100%, 23 нт	mRNA 5'-GCUCGCGCUCACGCGUCCCCCAG-3' ||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-CGAGCGCGAGUGCGCAGGGGGUC-5'
Csa: -132 кДж/моль, 97%, 23 нт	mRNA 5'-GCUCGCGCUCACGCGUC**U**CCCAG-3' ||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-CGAGCGCGAGUGCGCAG**G**GGGUC-5'
Rno: -127 кДж/моль, 94%, 23 нт	mRNA 5'-GC**C**CGCGCUCACGCGUC**U**CCC**G**G-3' ||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-CG**A**GCGCGAGUGCGCAG**G**GGG**U**C-5'
*Примечание: Жирным шрифтом отмечены нуклеотиды неканонических пар U-G, A-C.	

Для miR-4665-3p энергия взаимодействия с mRNA гена *KIAA2026* видов *G. gorilla, C. sabaeus, M. fascicularis, M. mulatta, N. leucogenys, P. anubis* и *R. roxellana* составляет -155 кДж/моль благодаря взаимодействию неканонических пар U и G, A и C. Для miR-4665-5p свободные энергии взаимодействия с mRNA гена *KIAA2026* видов *C. sabaeus* и *R. norvegicus* составляют -132 кДж/моль и -127 кДж/моль, соответственно, так как неканонические пары U-G и A-C также взаимодействуют между собой. miR-4665-5p связывается в 5'UTR и CDS mRNA *EFEMP1* и *ZFP36L2*, участвующих в развитии рака молочной железы и рака поджелудочной железы. Они имеют сайты связывания с одинаковой степенью комплементарности равной 91% и одинаковой свободной энергией взаимодействия, равной -123 кДж/моль (таблица 56).

Взаимодействие miR-135a-5p и miR-135a-3p в mRNA гена GLYCTK

Сайты связывания для miR-135a-5p и miR-135a-3p были обнаружены в 3'UTR mRNA *GLYCTK* гена (таблица 59). Для miR-135a-5p длиной 23 нт и miR-135a-3p длиной 22 нт энергии взаимодействия с mRNA составляли -113 кДж/моль и -121 кДж/моль, соответственно (таблица 59). Консервативность

нуклеотидных последовательностей сайтов связывания miR-135a-5p и miR-135a-3p предполагает, что взаимодействие между ними и их геном-мишенью *GLYCTK* возникло и сохранялось в ходе эволюции. Были определены характеристики сайтов связывания для miR-135a-3p и miR-135a-5p. Для miR-135a-3p, ассоциированного с геном *GLYCTK*, взаимодействие с CDS mRNA *ILDR1*, который участвует в развитии лимфомы, имеет свободную энергию взаимодействия -110 кДж/моль (таблица 56).

Таблица 59 - Схемы взаимодействий miR-135a-3p и miR-135a-5p с 3'UTR mRNA ортологичных генов *GLYCTK* [288, с. 612-623; 289, с. 692-704; 290, с. 6-7].

Объект, характеристики связывания	miR-135a-3p
Hsa, Ggo, Ppa, Mmu, Ptr, Rno: -121 кДж/моль, 100%, 22 нт	mRNA 5'-CGCCACGGCUCCAAUCCCUAUA-3' |||||||||||||||||||| miRNA 3'-GCGGUGCCGAGGUUAGGGAUAU-5'
Объект, характеристики связывания	miR-135a-5p
Hsa, Ggo, Ppa, Mmu, Ptr, Rno: -113 кДж/моль, 100%, 23 нт	mRNA 5'-UCACAUAGGAAUAAAAAGCCAUA-3' |||||||||||||||||||||| miRNA 3'-AGUGUAUCCUUAUUUUUCGGUAU-5'

Взаимодействия miR-7106-5p и miR-7106-3p в mRNA CCDC42B

Сайты связывания для miR-7106-5p и miR-7106-3p были установлены в 3'UTR mRNA *CCDC42B* гена (таблица 60). Для miR-7106-3p, длиной 23 нт, свободная энергия взаимодействия с mRNA гена *CCDC42B* видов *H. sapiens, M. mulatta, R. bieti* и *R. roxellana* составляет -127 кДж/моль, а для miR-7106-5p, длиной 20 нт, свободная энергия взаимодействия с mRNA гена *CCDC42B* видов *H. sapiens, M. mulatta, R. bieti, R. roxellana* и *A. naphthalenivorans* составляет -113 кДж/моль (таблица 60).

Для miR-7106-3p свободная энергия взаимодействия с mRNA гена *CCDC42B* видов *P. abelii* и *A. naphthalenivorans* составляет -125 кДж/моль и -121 кДж/моль, соответственно. Для miR-7106-5p свободная энергия взаимодействия с mRNA гена *CCDC42B P. abelii* составляет -108 кДж/моль. Для miR-7106-5p и miR-7106-3p, ассоциированных с геном *CCDC42B*, десять сайтов связывания были обнаружены в 5'UTR, 3'UTR и CDS mRNA генов, участвующих при раке молочной железы, раке толстой кишки, плоскоклеточном раке пищевода, раке предстательной железы, раке желудка, нейробластоме, раке шейки матки, остеосаркоме, раке яичника, колоректальном раке, гепатоцеллюлярной карциноме и раке поджелудочной железы. Эти miRNA взаимодействовали со свободной энергией в диапазоне от -104 кДж/моль до -115 кДж/моль (таблица 56).

Таким образом, было продемонстрировано влияние miRNA, ассоциированных с генами *CCDC42B, FOXF2, GLYCTK, KIAA2026* и *PLPPR3*, на различные гены-мишени, которые участвуют в различных онкологических заболеваниях. Примечательно, что все нуклеотиды miRNA и их сайты связывания взаимодействовали без образования "пузырей"

(таблицы 58-60).

Таблица 60 - Схемы взаимодействия miR-7106-3p и miR-7106-5p с 3'UTR mRNA ортологичных генов *CCDC42B* [288, с. 612-623; 289, с. 692-704; 290, с. 6-7].

Объект, характеристики связывания	miR-7106-3p
Hsa, Mml, Rbi, Rro: -127 кДж/моль, 100%, 23 нт	mRNA 5'-CUGGGACAGGGAUUCAGGGAGCU-3' ||||||||||||||||||||||| miRNA 3'-GACCCUGUCCCUAAGUCCCUCGA-5'
Pab: -125 кДж/моль, 98%, 23 нт	mRNA 5'-C**C**GGGACAGGGAUUCAGGGAGCU-3' |**|**||||||||||||||||||| miRNA 3'-G**A**CCCUGUCCCUAAGUCCCUCGA-5'
Ana: -121 кДж/моль, 95%, 23 нт	mRNA 5'-C**C**GGGACAGGGAUUCAGGGAG**U**U-3' |**|**||||||||||||||||||**|**| miRNA 3'-G**A**CCCUGUCCCUAAGUCCCUC**G**A-5'
Объект, характеристики связывания	miR-7106-5p
Hsa, Mml, Rbi, Rro, Ana: -113 кДж/моль, 100%, 20 нт	mRNA 5'-CCCAAGAUCCCCUCCUCCCA-3' |||||||||||||||||| miRNA 3'-GGGUUCUAGGGGAGGAGGGU-5'
Pab: -108 кДж/моль, 96%, 20 нт	mRNA 5'-CCCAAGAUCCCCUCCUC**U**CA-3' ||||||||||||||||**|**|| miRNA 3'-GGGUUCUAGGGGAGGAG**G**GU-5'
Примечания: Жирным шрифтом обозначены нуклеотиды неканонических пар U и G, A и C	

Взаимодействия нуклеотидов, соединенных водородными связями, были дополнительно стабилизированы стэкинг взаимодействиями всех нуклеотидов. Средняя свободная энергия взаимодействий для сайтов связывания пар miR-5p/miR-3p в mRNA генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* варьировала: -144 кДж/моль в 5’UTR, -137 кДж/моль в CDS и -118 кДж/моль в 3'UTR. Следовательно, связывание miRNA в начале mRNA будет более эффективно ингибировать трансляцию, что уменьшит потерю энергии в случае прекращения трансляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установление ассоциаций miRNA с mRNA предполагает использование их для разработки методов ранней диагностики субтипов рака молочной железы. Материалом для анализа может служить кровь пациентов, в которой циркулируют miRNA в свободном состоянии и в составе экзосом. Использование всех установленных в настоящей работе ассоциаций miRNA с mRNA кандидатных генов требует относительно больших материальных затрат, поэтому в таблицах 44, 46 и 48 приведены те ассоциации, которые включают наиболее вероятные кандидатные гены и miRNA, сильно взаимодействующие с mRNA этих генов. Отметим, что выявленные ассоциации можно использовать для установления субтипов на биопсийном материале и в послеоперационных образцах опухоли. Такой анализ необходим для применения специфической терапии заболевания, которая должна быть таргетной по отношению к генам, являющимся основной причиной развития субтипов заболевания.

Полученные в работе результаты дают основание сделать следующие положения.

Установленные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов *E2F* демонстрируют возможность регуляции экспресии генов семейства *E2F* с помощью многих miRNA. Гены *E2F1-E2F3*, участвующие в клеточном цикле, и гены *E2F4-E2F8*, участвующие в апоптозе, в разной степени подвержены влиянию miRNA.

Установлены гены, которые участвуют в развитии рака молочной железы и являются мишенями для miR-1322. Особенностью mRNA этих генов является кодирование сайтами связывания miR-1322 гомоолигопептидов.

Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов специфичны для каждого субтипа рака молочной железы, и могут использоваться при подборе ассоциаций для ранней диагностики субтипов РМЖ. В каждой группе кандидатных генов имеются ассоциации miRNA и их генов мишеней, которые имеют повышенную степень взаимодействия и могут служить маркерами для разработки методов ранней диагностики субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative.

Средняя величина свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов всех субтипов больше в 5'UTR и CDS по сравнению с 3'UTR, что предполагает предпочтительное связывание miRNA в 5'UTR и CDS.

Организация сайтов связывания miRNA с mRNA в кластеры, содержащие два и более сайтов связывания с наложением их нуклеотидных последовательностей, позволяет многократно уменьшить долю нуклеотидных последовательностей сайтов связывания в нуклеотидной последовательности mRNA. Наложение сайтов связывания miRNA создает конкуренцию между miRNA за сайты связывания в кластере, так как комплекс RISC с miRNA, имеющей большую величину свободной энергии

взаимодействия не позволит связываться другому комплексу RISC с miRNA, имеющей более слабое взаимодействие с mRNA.

Гены *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* из 17508 генов человека, являются мишенями miRNA, связывающимися полностью комплементарно с их mRNA. Высокая консервативность сайтов связывания miRNA в mRNA генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* в течение десятков миллионов лет эволюции изучаемых видов животных подтверждает, что miRNA-опосредованная регуляция экспрессии этих генов появилась на ранних этапах эволюции животных. Ассоциации пяти пар miR-5p/miR-3p с mRNA генов *FOXF2, PLPPR3, KIAA2026, GLYCTK* и *CCDC42B* могут служить основой разработки методов ранней диагностики рака молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. В формате для использования программой MirTarget созданы базы из 6226 miRNA и 602 кандидатных генов рака молочной железы для расчета характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов мишеней. Созданы выборки кандидатных генов субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative рака молочной железы.

2. Установлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов E2F, которые участвуют в регуляции клеточного цикла (*E2F1-E2F3*) и апоптоза (*E2F4-E2F8*). Некоторые гены, участвующие в развитии рака молочной железы, являются мишенями для miR-1322, полисайты связывания которой кодируют олигопептиды.

3. Определены начало и локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 31 кандидатных генов субтипа HER2 рака молочной железы.

4. Обнаружены сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, предсказана их структурная организация, вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 20 кандидатных генов субтипов luminal A и B рака молочной железы.

5. Вычислены величины свободной энергии взаимодействия miRNA с mRNA, определены начало и локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA, составлены схемы связывания нуклеотидов miRNA с mRNA 50 кандидатных генов субтипа triple-negative рака молочной железы.

6. В каждой из mRNA 101 кандидатных генов рака молочной железы установлена локализация сайтов связывания miRNA. В mRNA 25 генов

выявлена организация сайтов связывания miRNA в кластеры, состоящие из сайтов связывания двух и более miRNA. Кластерная организация сайтов связывания приводит к компактизации сайтов связывания и конкуренции между miRNA за связывание в кластере.

7. Установлены характеристики сайтов связывания пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA ортологичных генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*, которые были сходными, что свидетельствует о раннем возникновении и высокой консервативности связи miRNA с mRNA у гоминидов. Выявлены ассоциации пар miRNA-5p и miRNA-3p с mRNA генов-мишеней которые предлагаются для разработки методов диагностики рака молочной железы.

8. Выявленные семь, семь и одиннадцать ассоциаций miRNA и кандидатных генов соответственно субтипов HER2, luminal A и B, triple-negative рака молочной железы рекомендуются для разработки методов диагностики этих субтипов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 The World Health Organization. 10 leading causes of death in the world // Informational Bulletin of WHO. - 2014. - Vol. 92. - P. 1-74.

2 Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours // Nature. - 2012. - Vol. 490, № 7418. - P. 61-70.

3 Abiltayeva A., Moore M.A., Myssayev A., Adylkhanov T., Baissalbayeva A., Zhabagin K., Beysebayev E. Clinical, histopathological and molecular characteristics of metastatic breast cancer in North-Eastern Kazakhstan: a 10 year retrospective study // Asian Pac J Cancer Prev. - 2016.- Vol. 17. - P. 4797-4802.

4 Shiovitz S., Korde L.A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution // Ann Oncol. - 2015. - Vol. 26, № 7. - P. 1291-1299.

5 Lagendijk M., Sadaatmand S., Koppert L.B., Tilanus-Linthorst M.M.A., de Weerd V., Ramírez-Moreno R., Smid M., Sieuwerts A.M., Martens J.W.M. MicroRNA expression in pre-treatment plasma of patients with benign breast diseases and breast cancer // Oncotarget. - 2018. - Vol. 9, № 36. - P. 24335-24346.

6 Bray F., Ferlay J., Laversanne M., Brewster D.H., Gombe Mbalawa C., Kohler B., Piñeros M., Steliarova-Foucher E., Swaminathan R., Antoni S., Soerjomataram I., Forman D. Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration // Int J Cancer. - 2015. - Vol. 137, № 9. - P. 2060-2071.

7 Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // Int J Cancer. - 2015. - Vol. 136, № 5. - P. E359-86.

8 Beysebayev E., Bilyalova Z., Kozhakeeva L., Baissalbayeva A., Abiltayeva A. Spatial and temporal epidemiological assessment of breast cancer incidence and mortality in Kazakhstan, 1999-2013 // Asian Pac J Cancer Prev. - 2015. - Vol. 16. - P. 6795.

9 Beysebayev E., Tulebayev K., Meymanalyev T. Breast cancer diagnosis by mammography in Kazakhstan - staging results of breast cancer with double reading // Asian Pac J Cancer Prev. - 2015. -Vol. 13. - P. 2341-2344.

10 Igissinov N., Igissinov S., Moore M.A., Shaidarov M., Tereshkevich D., Bilyalova Z., Igissinova G., Nuralina I., Kozhakhmetov S. Trends of prevalent cancer incidences in the Aral-Syr Darya ecological area of Kazakhstan // Asian Pac J Cancer Prev. - 2011. -Vol. 12, № 9. - P. 2299-2303.

11 Abiltayeva A., Moore M.A., Myssayev A., Adylkhanov T., Baissalbayeva A., Zhabagin K., Beysebayev E. Clinical, Histopathological and Molecular Characteristics of Metastatic Breast Cancer in North-Eastern Kazakhstan: a 10 Year Retrospective Study // Asian Pac J Cancer Prev. - 2016. - Vol. 17, № 10. - P. 4797-4802.

12 Dickens C., Joffe M., Jacobson J., Venter F., Schüz J., Cubasch H., McCormack V. Stage at breast cancer diagnosis and distance from diagnostic hospital in a periurban setting: a South African public hospital case series of over 1,000 women // Int J Cancer. - 2014. - Vol. 135, № 9. - P. 2173-2182.

13 Jassem J., Ozmen V., Bacanu F., Drobniene M., Eglitis J., Lakshmaiah K.C., Kahan Z., Mardiak J., Pieńkowski T., Semiglazova T., Stamatovic L., Timcheva C., Vasovic S., Vrbanec D., Zaborek P. Delays in diagnosis and treatment of breast cancer: a multinational analysis // Eur J Public Health. - 2014. - Vol. 24, № 5. - P. 761-767.

14 Denoix P.F. Nomenclature des cancers // Bull Inst Nat Hyg (Paris). - 1952. - P. 743-748.

15 Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours // International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell. - 2009. - 7th edition. - P. 1-332.

16 Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours // Union For International Cancer Control. Wiley-Blackwell. - 2017. - 8th edition. - P. 1-241.

17 Malhotra G.K., Zhao X., Band H., Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers // Cancer Biol Ther. - 2010. - Vol. 10, № 10. - P. 955-960.

18 Li C.I., Uribe D.J., Daling J.R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer // Br J Cancer. - . 2005. -Vol. 93. - P. 1046-1052.

19 Cipollini G., Tommasi S., Paradiso A., Aretini P., Bonatti F., Brunetti I., Bruno M., Lombardi G., Schittulli F., Sensi E., Tancredi M., Bevilacqua G., Caligo M.A. Genetic alterations in hereditary breast cancer // Ann Oncol. - 2004. - Vol. 15. - P. I7-13.

20 Watson I.R., Takahashi K., Futreal P.A., Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer // Nat Rev Genet. - 2013. - Vol. 14, № 10. - P. 703-718.

21 Stadler J., Richly H. Regulation of DNA Repair Mechanisms: How the Chromatin Environment Regulates the DNA Damage Response // Int J Mol Sci. - 2017. - Vol. 18, № 8. - P. E1715.

22 Wu S., Powers S., Zhu W., Hannun Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development // Nature. - 2016. - Vol. 529, № 7584. - P. 43-47.

23 Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer // Cell. - 2017. - Vol. 168, № 4. - P. 644-656.

24 Engin A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors // Adv Exp Med Biol. - 2017. - Vol. 960. - P. 571-606.

25 Skol A.D., Sasaki M.M., Onel K. The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance // Breast Cancer Res. - 2016. - Vol. 18, № 1. - P. 99.

26 Kaminska M., Ciszewski T., Lopacka-Szatan K., Miotla P., Staroslawska E. Breast cancer risk factors // Prz Menopauzalny. - 2015. - Vol. 14, № 3. - P. 196-202.

27 Sun Y.S., Zhao Z., Yang Z.N., Xu F., Lu H.J., Zhu Z.Y., Shi W., Jiang J., Yao P.P., Zhu H.P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer // Int J Biol Sci. - 2017. - Vol. 13, № 11. - P. 1387-1397.

28 Singletary S.E. Rating the risk factors for breast cancer //Ann Surg. - 2003. - Vol. 237, № 4. - P. 474-482.

29 Howell A., Anderson A.S., Clarke R.B., Duffy S.W., Evans D.G., Garcia-Closas M., Gescher A.J., Key T.J., Saxton J.M., Harvie M.N. Risk determination and prevention of breast cancer // Breast Cancer Res. - 2014. - Vol. 16, № 5. - P. 446.

30 Anothaisintawee T., Wiratkapun C., Lerdsitthichai P., Kasamesup V., Wongwaisayawan S., Srinakarin J., Hirunpat S., Woodtichartpreecha P., Boonlikit S., Teerawattananon Y., Thakkinstian A. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis // Asia Pac J Public Health. - 2013. - Vol. 25, № 5. - P. 368-387.

31 Ozsoy A., Barca N., Dolek B.A., Aktaş H., Elverici E., Araz L., Ozkaraoğlu O. The Relationship Between Breast Cancer and Risk Factors: A Single-Center Study // Eur J Breast Health. - 2017. - Vol. 13, № 3. - P. 145-149.

32 McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? // Oncologist. - 2003. - Vol. 8, № 4. - P. 326-334.

33 Patterson R.E., Cadmus L.A., Emond J.A., Pierce J.P. Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: a review of the epidemiologic literature // Maturitas. - 2010. - Vol. 66, № 1. - P. 5-15.

34 Rock C.L., Demark-Wahnefried W. Can life style modification increase survival in women diagnosed with breast cancer? // J Nutr. - 2002. - Vol. 132, № 11. - P. 3504S-3507S.

35 Yang X.R., Sherman M.E., Rimm D.L., Lissowska J., Brinton L.A., Peplonska B., Hewitt S.M., Anderson W.F., Szeszenia-Dabrowska N., Bardin-Mikolajczak A., Zatonski W., Cartun R., Mandich D., Rymkiewicz G., Ligaj M., Lukaszek S., Kordek R., García-Closas M. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. - 2007. - Vol. 16, № 3. - P. 439-443.

36 Barnard M.E., Boeke C.E., Tamimi R.M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes // Biochim Biophys Acta. - 2015. - Vol. 1856, № 1. - P. 73-85.

37 Anderson W.F., Rosenberg P.S., Prat A., Perou C.M., Sherman M.E. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? // J Natl Cancer Inst. - 2014. - Vol. 106, № 8. - P. dju165.

38 Colditz G.A., Kaphingst K.A., Hankinson S.E., Rosner B. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study // Breast Cancer Res Treat. - 2012. - Vol. 133, № 3. - P. 1097-1104.

39 Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G. Breast cancer // Lancet. - 2005. - Vol. 365, № 9472. - P. 1727-1741.

40 Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W. Cancer genome landscapes // Science. - 2013. - Vol. 339, № 6127. - P. 1546-1558.

41 Domchek S.M., Friebel T.M., Singer C.F., Evans D.G., Lynch H.T., Isaacs C., Garber J.E., Neuhausen S.L., Matloff E., Eeles R., Pichert G., Van t'veer L., Tung N., Weitzel J.N., Couch F.J., Rubinstein W.S., Ganz P.A., Daly M.B.,

Olopade O.I., Tomlinson G., Schildkraut J., Blum J.L., Rebbeck T.R. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality // JAMA. - 2010. - Vol. 304, № 9. - P. 967-975.

42 Finch A.P., Lubinski J., Møller P., Singer C.F., Karlan B., Senter L., Rosen B., Maehle L., Ghadirian P., Cybulski C., Huzarski T., Eisen A., Foulkes W.D., Kim-Sing C., Ainsworth P., Tung N., Lynch H.T., Neuhausen S., Metcalfe K.A., Thompson I., Murphy J., Sun P., Narod S.A. Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation // J Clin Oncol. - 2014. - Vol. 32, № 15. - P. 1547-1553.

43 Bernstein J.L., Concannon P. ATM, radiation, and the risk of second primary breast cancer // International Journal of Radiation Biology. - 2017. - Vol. 93, № 10. - P. 1121-1127.

44 Apostolou P., Papasotiriou I. Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer // Breast Cancer (Dove Med Press). - 2017. - Vol. 9. - P. 331-335.

45 Whibley C., Pharoah P.D., Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications // Nat Rev Cancer. - 2009. - Vol. 9. - P. 95-107.

46 Antoniou A.C., Foulkes W.D., Tischkowitz M. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2 // N Engl J Med. - 2014. - Vol. 371, № 17. - P. 497-506.

47 Lo P.K. The controversial role of forkhead box F2 (FOXF2) transcription factor in breast cancer // PRAS Open. - 2017. - Vol. 1. - P. 9.

48 Lo P.K., Lee J.S., Liang X., Sukumar S. The dual role of FOXF2 in regulation of DNA replication and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression // Cell Signal. - 2016. - Vol. 28, № 10. - P. 1502-1519.

49 Wang Q.S., Kong P.Z., Li X.Q., Yang F., Feng Y.M. FOXF2 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of basal-like breast cancer // Breast Cancer Res. - 2015. - Vol. 17. - P. 30.

50 Kong P.Z., Yang F., Li L., Li X.Q., Feng Y.M. Decreased FOXF2 mRNA expression indicates earlyonset metastasis and poor pro gnosis for breast cancer patients with histological grade II tumor // PLoS One. - Vol. 8, № 4. - P. e61591. doi: 10.1371/journal.pone.0061591.

51 Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. MicroRNA regulation of macrophages in human pathologies // J Mol Cell Cardiol. - 2016 - Vol. 94. - P. 107-121.

52 Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. - 2000. - Vol. 406, № 6797. - P. 747-752.

53 Sørlie T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2001. - Vol. 19, № 98. - P. 10869-10874.

54 Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J.S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C.M., Lønning P.E., Brown P.O., Børresen-Dale A.L., Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. - Vol. 14, № 100. - P. 8418-8423.

55 Sotiriou C., Neo S.Y., McShane L.M., Korn E.L., Long P.M., Jazaeri A., Martiat P., Fox S.B., Harris A.L., Liu E.T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. - Vol. 18, № 100. - P. 10393-10398.

56 Yu Z.H., Lun S.M., He R., Tian H.P., Huang H.J., Wang Q.S., Li X.Q., Feng Y.M. Dual function of MAZ mediated by FOXF2 in basal-like breast cancer: Promotion of proliferation and suppression of progression // Cancer Lett. - 2017. - Vol. 402. - P. 142-152.

57 Farshid G., Walters D. Molecular subtypes of screen-detected breast cancer // Breast Cancer Res Treat. - 2018. - Vol. 172, № 1. - P. 191-199.

58 Islakoglu Y.O., Noyan S., Aydos A., Dedeoglu B.G. Meta-microRNA Biomarker Signatures to Classify Breast Cancer Subtypes // OMICS. - 2018. - Vol. 22, № 11. - P. 1-8. doi: 10.1089/omi.2018.0157.

59 Rakha E.A., Green A.R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know // Pathology. - 2017. - Vol. 49, № 2. - P. 111-119.

60 Spitale A., Mazzola P., Soldini D., Mazzucchelli L., Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland // Ann. Oncol. - 2009. - Vol. 20, № 4. - P. 628-635.

61 Tang P., Tse G.M. Immunohistochemical surrogates for molecular classification of breast carcinoma: a 2015 update // Arch. Pathol. Lab. Med. - 2016. - Vol. 140, № 8. - P. 806-814.

62 Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A., Dressler L.G., Cowan D., Conway K., Karaca G., Troester M.A., Tse C.K., Edmiston S., Deming S.L., Geradts J., Cheang M.C., Nielsen T.O., Moorman P.G., Earp H.S., Millikan R.C. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study // JAMA. - 2006. - Vol. 21, № 295. - P. 2492-2502.

63 Foulkes W.D., Stefansson I.M., Chappuis P.O., Bégin L.R., Goffin J.R., Wong N., Trudel M., Akslen L.A. Germline *BRCA1* mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer // J. Natl. Cancer Inst. - 2003. - Vol. 19, № 95. - P. 1482-1485.

64 Liu H., Fan Q., Zhang Z., Li X., Yu H., Meng F. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers // Hum. Pathol. - 2008. - Vol. 2, № 39. - P. 167-174.

65 Yeo S.K., Guan J.L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? // Trends Cancer. - 2017. - Vol. 3, № 11. - P. 753-760.

66 Shendure J., Ji H. Next-generation DNA sequencing // Nature biotechnology. - 2008, Vol. 26. - P. 1135-1145.

67 Dewey F.E., Grove M.E., Pan C., Goldstein B.A., Bernstein J.A., Chaib H., Merker J.D., Goldfeder R.L., Enns G.M., David S.P., Pakdaman N., Ormond K.E., Caleshu C., Kingham K., Klein T.E., Whirl-Carrillo M., Sakamoto K., Wheeler M.T., Butte A.J., Ford J.M., Boxer L., Ioannidis J.P., Yeung A.C., Altman R.B., Assimes T.L., Snyder M., Ashley E.A., Quertermous T. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing // JAMA. - 2014. - Vol. 311, № 10. - P. 1035-1045.

68 Kurian A.W., Ford J.M. Multigene Panel Testing in Oncology Practice: How Should We Respond? // JAMA oncology. - 2015, Vol 1. - P. 277-278.

69 Evans D.G., Kesavan N., Lim Y., Gadde S., Hurley E., Massat N.J., Maxwell A.J., Ingham S., Eeles R., Leach M.O., Howell A., Duffy S.W. MRI breast screening in high-risk women: cancer detection and survival analysis // Breast cancer research and treatment. - 2014. - Vol. 145, № 3. - P. 663-672.

70 Heijnsdijk E.A., Warner E., Gilbert F.J., Tilanus-Linthorst M.M., Evans G., Causer P.A., Eeles R.A., Kaas R., Draisma G., Ramsay E.A., Warren R.M., Hill K.A., Hoogerbrugge N., Wasser M.N., Bergers E., Oosterwijk J.C., Hooning M.J., Rutgers E.J., Klijn J.G., Plewes D.B., Leach M.O., de Koning H.J. Differences in natural history between breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and effects of MRI screening-MRISC, MARIBS, and Canadian studies combined // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. - 2012. - Vol. 21, № 9. - P. 1458-1468.

71 Warner E., Hill K., Causer P., Plewes D., Jong R., Yaffe M., Foulkes W.D., Ghadirian P., Lynch H., Couch F., Wong J., Wright F., Sun P., Narod S.A. Prospective study of breast cancer incidence in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation under surveillance with and without magnetic resonance imaging // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. - 2011. - Vol. 29, № 13. - P. 1664-1669.

72 Warner E., Messersmith H., Causer P., Eisen A., Shumak R., Plewes D. Systematic review: using magnetic resonance imaging to screen women at high risk for breast cancer // Ann Intern Med. - 2008. - Vol. 148, № 9. - P. 671-679.

73 Kurian A.W., Munoz D.F., Rust P., Schackmann E.A., Smith M., Clarke L., Mills M.A., Plevritis S.K. Online tool to guide decisions for BRCA1/2 mutation carriers // Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. - 2012. - Vol. 30, № 5. - P. 497-506.

74 Kurian A.W., Sigal B.M., Plevritis S.K. Survival analysis of cancer risk reduction strategies for BRCA1/2 mutation carriers // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. - 2010. - Vol. 28, № 2. - P. 222-231.

75 Podo F., Santoro F., Di Leo G., Manoukian S., de Giacomi C., Corcione S., Cortesi L., Carbonaro L.A., Trimboli R.M., Cilotti A., Preda L., Bonanni B., Pensabene M., Martincich L., Savarese A., Contegiacomo A., Sardanelli F. TripleNegative versus Non-Triple-Negative Breast Cancers in High-Risk Women: Phenotype Features 21 and Survival from the HIBCRIT-1 MRI-Including Screening Study // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. - 2016. - Vol. 22, № 4. - P. 895-904.

76 Saadatmand S., Obdeijn I.M., Rutgers E.J., Oosterwijk J.C., Tollenaar R.A., Woldringh G.H., Bergers E., Verhoef C., Heijnsdijk E.A., Hooning M.J., de Koning H.J., Tilanus-Linthorst M.M. Survival benefit in women with BRCA1 mutation or familial risk in the MRI screening study (MRISC) // International journal of cancer Journal international du cancer. - 2015. - Vol. 137, № 7. - P. 1729-1738.

77 Tung N., Domchek S.M., Stadler Z., Nathanson K.L., Couch F., Garber J.E., Offit K., Robson M.E. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations // Nature reviews Clinical oncology. - 2016. - Vol. 13, № 9. - P. 581-588.

78 Makretsov N.A., Huntsman D.G., Nielsen T.O. Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma // Clin Cancer Res. - 2004. - Vol. 10. - P. 6143-6151.

79 Zardavas D., Pugliano L., Piccart M. Personalized therapy for breast cancer: a dream or a reality? // Future Oncology. - 2013. - Vol. 9. - P. 1105-19.

80 Mishra A., Verma M. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? // Cancers. - 2010. - Vol. 2, № 1. - P. 190-208.

81 Ventura A. C., Merajver S. D. Genetic determinants of aggressive breast cancer // Annual Review of Medicine. - 2008. - Vol. 59. - P. 199-212.

82 Zhang L., Xu Y., Jin X., Wang Z., Wu Y., Zhao D., Chen G., Li D., Wang X., Cao H., Xie Y., Liang Z. A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer // Breast Cancer Res Treat. - 2015. - Vol. 154, № 2. - P. 423-434.

83 Luo J., Zhao Q., Zhang W., Zhang Z., Gao J., Zhang C., Li Y., Tian Y. A novel panel of microRNAs provides a sensitive and specific tool for the diagnosis of breast cancer // Mol Med Rep. - 2014. - Vol. 10, № 2. - P. 785-791.

84 Strom A., Hartman J., Foster J.S., Kietz S., Wimalasena J., Gustafsson J.A. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D // Proc Natl Acad Sci USA. - 2004. - Vol. 101, № 6. - P. 1566-1571.

85 Salazar N., Muñoz D., Kallifatidis G., Singh R.K., Jordà M., Lokeshwar B.L. The chemokine receptor CXCR7 interacts with EGFR to promote breast cancer cell proliferation // Mol Cancer. - 2014. - Vol. 13, № 1. - P. 198.

86 Cimino-Mathews A., Subhawong A.P., Illei P.B., Sharma R., Halushka M.K., Vang R., Fetting J.H., Park B.H., Argani P. GATA3 expression in breast carcinoma: utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas // Hum Pathol. - 2013. - Vol. 44, № 7. - P. 1341-1349.

87 Byrne D.J., Deb S., Takano E.A., Fox S.B. GATA3 expression in triple-negative breast cancers // Histopathology. - 2017. - Vol. 71, № 1. - P. 63-71.

88 Deftereos G., Sanguino Ramirez A.M., Silverman J.F., Krishnamurti U. GATA3 immunohistochemistry expression in histologic subtypes of primary breast carcinoma and metastatic breast carcinoma cytology // Am J Surg Pathol. - 2015. - Vol. 39, № 9. - P. 1282-1289.

89 Gonzalez R.S., Wang J., Kraus T., Sullivan H., Adams A.L., Cohen C. GATA-3 expression in male and female breast cancers: comparison of clinicopathologic parameters and prognostic relevance // Hum Pathol. - 2013. - Vol. 44, № 6. - P. 1065-1070.

90 Yoon N.K., Maresh E.L., Shen D., Elshimali Y., Apple S., Horvath S., Mah V., Bose S., Chia D., Chang H.R., Goodglick L. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer // Hum Pathol. - 2010. - Vol. 41, № 12. - P. 1794-1801.

91 Mehra R., Varambally S., Ding L., Shen R., Sabel M.S., Ghosh D., Chinnaiyan A.M., Kleer C.G. Identification of GATA3 as a Breast Cancer Prognostic Marker by Global Gene Expression Meta-analysis // Cancer Res. - 2005. - Vol. 65, № 24. - P. 11259-11264.

92 Vaquerizas J.M., Kummerfeld S.K., Teichmann S.A., Luscombe N.M. A census of human transcription factors: Function, expression and evolution // Nat Rev Genet. - 2009. - Vol. 10. - P. 252-263.

93 Lee T.I., Young R.A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease // Cell. - 2013. - Vol. 152. - P. 1237-1251.

94 Konstantinopoulos P.A., Papavassiliou A.G. Seeing the future of cancerassociated transcription factor drug targets // JAMA. - 2011. - Vol. 305. - P. 2349-2350.

95 Yeh J.E., Toniolo P.A., Frank D.A. Targeting transcription factors: Promising new strategies for cancer therapy // Curr Opin Oncol. - 2013. - Vol. 25. - P. 652-658

96 Darnell J.E. Transcription factors as targets for cancer therapy // Nat Rev Cancer. - 2002. - Vol. 2. - P. 740-749.

97 Garraway L.A., Lander E.S. Lessons from the cancer genome // Cell. - 2013. - Vol. 153. - P. 17-37.

98 Khoo K.H., Verma C.S., Lane D.P. Drugging the p53 pathway: Understanding the route to clinical efficacy // Nat Rev Drug Discov. - 2014. - Vol. 13. - P. 217-236.

99 Lane D., Levine A. p53 research: The past thirty years and the next thirty years // Cold Spring Harb Perspect Biol. - 2010. - Vol. 2. - P. a000893.

100 Bieging K.T., Mello S.S., Attardi L.D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression // Nat Rev Cancer. - 2014. - Vol. 14. - P. 359-370.

101 Silwal-Pandit L., Vollan H., Chin S. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance // Clin Cancer. - 2014. - P. 3569-3580.

102 Kar A., Gutierrez-Hartmann A. Molecular mechanisms of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis // Crit Rev Biochem Mol Biol. - 2013. - Vol. 48. - P. 522-543.

103 Pattabiraman D.R., McGirr C., Shakhbazov K., Barbier V., Krishnan K., Mukhopadhyay P., Hawthorne P., Trezise A., Ding J., Grimmond S.M., Papathanasiou P., Alexander W.S., Perkins A.C., Levesque J.P., Winkler I.G., Gonda T.J. Interaction of c-Myb with p300 is required for the induction of acute

myeloid leukemia (AML) by human AML oncogenes // Blood. - 2014. - Vol. 123. - P. 2682-2690.

104 Eferl R., Wagner E.F. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis // Nat Rev Cancer. - 2003. - Vol. 3. - P. 859-868.

105 Lin C.Y., Lov en J., Rahl P.B., Paranal R.M., Burge C.B., Bradner J.E., Lee T.I., Young R.A. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc // Cell. - 2012. - Vol. 151. - P. 56-67.

106 Tsantoulis P.K., Gorgoulis V.G. Involvement of E2F transcription factor family in cancer // Eur J Cancer. - 2005. - Vol. 41. - P. 2403-2414.

107 Attwooll C., Lazzerini D.E., Helin K. The E2F family: Specific functions and overlapping interests // EMBO J. - 2004. - Vol. 23. - P. 4709-4716.

108 Bell L.A., Ryan K.M. Life and death decisions by E2F1 // Cell Death Differ. - 2004. - Vol. 11. - P. 137-142.

109 Stevens C., La Thangue N.B. E2F and cell cycle control: A double-edged sword // Arch Biochem Biophys. - 2003. - Vol. 412. - P. 157-169.

110 Wu Z., Zheng S., Yu Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis // Int J Biochem Cell Biol. - 2009. - Vol. 41. - P. 2389-2397.

111 Jiang H., Martin V., Gomez Manzano C., Johnson D.G., Alonso M., White E., Xu J., McDonnell T.J., Shinojima N., Fueyo J. The RB E2F1 pathway regulates autophagy // Cancer Res. - 2010. - Vol. 70. - P. 7882-7893.

112 Gorgoulis V.G., Zacharatos P., Mariatos G., Kotsinas A., Bouda M., Kletsas D., Asimacopoulos P.J., Agnantis N., Kittas C., Papavassiliou A.G. Transcription factor E2F1 acts as a growth promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas // J Pathol. - 2002. - Vol. 198. - P. 142-156.

113 Huang C.L., Liu D., Nakano J., Yokomise H., Ueno M., Kadota K., Wada H. E2F1 overexpression correlates with thymidylate synthase and survivin gene expressions and tumor proliferation in non small cell lung cancer // Clin Cancer Res. - 2007. - Vol. 13. - P. 6938-6946.

114 Liu L.X., Jiang H.C., Liu Z.H., Zhu A.L., Zhang W.H., Wu L.F., Zhou J., Wang X.Q., Wu M. Expression of cell cycle/growth regulator genes in human hepatocellular carcinoma and adjacent normal liver tissues // Oncol Rep. - 2003. - Vol. 10. - P. 1771-1775.

115 Deng Q., Wang Q., Zong W.Y., Zheng D.L., Wen Y.X., Wang K.S., Teng X.M., Zhang X., Huang J., Han Z.G. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation // Cancer Res. - 2010. - Vol. 70. - P. 782-791.

116 Palaiologou M., Koskinas J., Karanikolas M., Fatourou E., Tiniakos D.G. E2F 1 is overexpressed and pro apoptotic in human hepatocellular carcinoma // Virchows Arch. - 2012. - Vol. 460. - P. 439-446.

117 De Meyer T., Bijsmans I.T., Van de Vijver K.K., Bekaert S., Oosting J., Van Criekinge W., van Engeland M., Sieben N.L. E2Fs mediate a fundamental cell cycle deregulation in high grade serous ovarian carcinomas // J Pathol. - 2009. - Vol. 217. - P. 14-20.

118 Reimer D., Sadr S., Wiedemair A., Goebel G., Concin N., Hofstetter G., Marth C., Zeimet A.G. Expression of the E2F family of transcription factors and its clinical relevance in ovarian cancer // Ann N Y Acad Sci. - 2006. - Vol. 1091. - P. 270-281.

119 Lu K.H., Patterson A.P., Wang L., Marquez R.T., Atkinson E.N., Baggerly K.A., Ramoth L.R., Rosen D.G., Liu J., Hellstrom I., Smith D., Hartmann L., Fishman D., Berchuck A., Schmandt R., Whitaker R., Gershenson D.M., Mills G.B., Bast R.C. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis // Clin Cancer Res. - 2004. - Vol. 10. - P. 3291-3300.

120 Han S., Park K., Bae B.N., Kim K.H., Kim H.J., Kim Y.D., Kim H.Y. E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide // Breast Cancer Res Treat. - 2003. - Vol. 82. - P. 11-16.

121 Rakha E.A., Pinder S.E., Paish E.C., Robertson J.F., Ellis I.O. Expression of E2F 4 in invasive breast carcinomas is associated with poor prognosis // J Pathol. - 2004. - Vol. 203. - P. 754-761.

122 Fujiwara K., Yuwanita I., Hollern D.P., Andrechek ER. Prediction and genetic demonstration of a role for activator E2Fs in Myc induced tumors // Cancer Res. - 2011. - Vol. 71. - P. 1924-1932.

123 Wilson R.C., Doudna J.A. Molecular mechanisms of RNA interference // Annu Rev Biophys. Annual Reviews. - 2013. - Vol. 42. - P. 217-239.

124 Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Brownstein M.J., Tuschl T., Margalit H. Clustering and conservation patterns of human microRNAs // Nucleic Acids Res. - 2005. - Vol. 33, № 8. - P. 2697-2706.

125 Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // Embo J. - 2004. - Vol. 23, № 20. - P. 4051-4060.

126 Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs // Nat Struct Mol Biol. - 2006. - Vol. 13. - P. 1097-1101.

127 Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs // Rna. - 2004. - Vol. 10. - P. 1957-1966.

128 Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // Genes Dev. - 2003. - Vol. 17, № 24. - P. 3011-3016.

129 Zeng Y., Cullen B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5 // Nucleic Acids Res. - 2004. - Vol. 32, № 16. - P. 4776-4785.

130 Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing // Cell. - 2005. - Vol. 123, № 4. - P. 631-640.

131 Feng Y., Zhang X., Graves P., Zeng Y. A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer // Rna. - 2012. - Vol. 18, № 11. - P. 2083-2092.

132 Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. Dicer is essential for mouse development // Nat Genet. - 2003. - Vol. 35, № 3. - P. 215-217.

133 Davis T.H., Cuellar T.L., Koch S.M., Barker A.J., Harfe B.D., McManus M.T., Ullian E.M. Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus // J Neurosci. - 2008. - Vol. 28, № 17. - P. 4322-4330.

134 Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing // Nature. - 2005. - Vol. 436, № 7051. - P. 740-744.

135 Maniataki E., Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA // Genes Dev. - 2005. - Vol. 19, № 24. - P. 2979-2990.

136 Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. - 2014. - Vol. 15, № 8. - P. 509-524.

137 Daschkey S., Rottgers S., Giri A., Bradtke J., Teigler-Schlegel A., Meister G., Borkhardt A., Landgraf P. MicroRNAs distinguish cytogenetic subgroups in pediatric AML and contribute to complex regulatory networks in AML-relevant pathways // PloS One. - 2013. - Vol. 8. - P. e56334.

138 Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex // Cell. - 2003. - Vol. 115. - P. 199-208.

139 Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // Cell. - 2003. - Vol. 115. - P. 209-216.

140 Romero-Cordoba S., Rodriguez-Cuevas S., Rebollar-Vega R., Quintanar-Jurado V., Maffuz-Aziz A., Jimenez-Sanchez G., Bautista-Pina V., Arellano-Llamas R., Hidalgo-Miranda A. Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer // PLoS One. - 2012. - Vol. 7. - P. e31904.

141 Marco A., Macpherson J.I., Ronshaugen M., Griffiths-Jones S. MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties // Silence. - 2012. - Vol. 3. - P. 8.

142 Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation // Essays biochem. - 2013. - Vol. 54. - 29-38. doi: 10.1042/bse0540029.

143 Duurusma A.M., Kedde M., Schrier M., le Sage C., Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region // RNA. - 2008. - Vol. 14, № 5. - P. 872-877.

144 Stroynowska-Czerwinska A., Fiszer A., Krzyzosiak W.J. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells // Cell. - 2014. - Mol. Life Sci. - Vol. 71, № 12. - P. 2253-2270.

145 Lim L.P., Lau N.C., Garret-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // Nature. - 2005. - Vol. 433, № 7027. - P. 769-773.

146 Selbach M., Schwanhausser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs // Nature. - 2008. - Vol. 455, № 7209. - P. 58-63.

147 Bazzini A.A., Lee M.T., Giraldez A.J. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish // Science. - 2012. - Vol. 336, № 6078. - P. 233-237.

148 Jonas S., Izzauralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing // Nat. Rev. Genet. - 2015. - Vol. 16, № 7. - P. 421-433.

149 Daschkey S., Rottgers S., Giri A., Bradtke J., Teigler-Schlegel A., Meister G., Borkhardt A., Landgraf P. MicroRNAs distinguish cytogenetic subgroups in pediatric AML and contribute to complex regulatory networks in AML-relevant pathways // PloS One. - 2013. - Vol. 8. - P. e56334.

150 Hutvagner G., Simard M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2008. - Vol. 9. - P. 22-32.

151 Ergün S., Ulasli M., Igci Y.Z., Igci M., Kırkbes S., Borazan E., Balik A., Yumrutaş Ö., Camci C., Cakmak E.A., Arslan A., Oztuzcu S. The association of the expression of miR-122-5p and its target ADAM10 with human breast cancer // Mol Biol Rep. - 2015. - Vol. 42, №. 2. - P. 497-505.

152 Hannafon B.N., Trigoso Y.D., Calloway C.L., Zhao Y.D., Lum D.H., Welm A.L., Zhao Z.J., Blick K.E., Dooley W.C., Ding W.Q. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer // Breast Cancer Research. - 2016. - Vol. 18. - P. 90.

153 Krishnan P., Ghosh S., Wang B., Li D., Narasimhan A., Berendt R., Graham K., Mackey J.R., Kovalchuk O., Damaraju S. Next generation sequencing profiling identifies miR-574-3p and miR-660-5p as potential novel prognostic markers for breast cancer // BMC Genomics. - 2015. - Vol. 16. - P. 735.

154 Li H.Y., Liang J.L., Kuo Y.L., Lee H.H., Calkins M.J., Chang H.T., Lin F.C., Chen Y.C., Hsu T.I., Hsiao M., Ger L.P., Lu P.J. miR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer // Breast Cancer Research. - 2017. - Vol. 19. - P. 133.

155 MacFarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer // Curr Genomics. - 2010. - Vol. 11, №. 7. - P. 537-561.

156 Wang J., Song C., Tang H., Zhang C., Tang J., Li X., Chen B., Xie X. miR-629-3p may serve as a novel biomarker and potential therapeutic target for lung metastases of triple-negative breast cancer // Breast Cancer Research. - 2017. - Vol. 19. - P. 72.

157 Xue J., Niu J., Wu J., Wu Z.H. MicroRNAs in cancer therapeutic response: Friend and foe // World J Clin Oncol. Baishideng Publishing Group Inc. - 2014. - Vol. 5, № 4. - P. 730-743.

158 Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs in cancer // Annu Rev Pathol. - 2014. - Vol. 9. - P. 287-314.

159 Kent O.A., Mendell J.T. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes // Oncogene. - 2006. - Vol. 25, № 46. - P. 6188-6196.

160 Hemmatzadeh M., Mohammadi H., Jadidi-Niaragh F., Asghari F., Yousefi M. The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer // Biomeédecine pharmacotheérapie. - 2016. - Vol. 78. - P. 129-139.

161 Shi X., Zhang H., Wang M., Xu X., Zhao Y., He R., Zhang M., Zhou M., Li X., Peng F., Shi C., Shen M., Wang X., Guo X., Qin R. LncRNA AFAP1-AS1 promotes growth and metastasis of cholangiocarcinoma cells // Oncotarget. - 2017. - Vol. 8, № 35. - P. 58394-58404.

162 Enerly E., Steinfeld I., Kleivi K., Leivonen S.K., Aure M.R., Russnes H.G., Rønneberg J.A., Johnsen H., Navon R., Rødland E., Mäkelä R., Naume B., Perälä M., Kallioniemi O., Kristensen V.N., Yakhini Z., Børresen-Dale A.L. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors // PLoS One. - 2011. - Vol. 6, № 2. - P. e16915.

163 Chen D., Si W., Shen J., Du C., Lou W., Bao C., Zheng H., Pan J., Zhong G., Xu L., Fu P., Fan W. miR-27b-3p inhibits proliferation and potentially reverses multi-chemoresistance by targeting CBLB/GRB2 in breast cancer cells // Cell Death Dis. - 2018. - Vol. 9, № 2. - P. 188.

164 Lyu H., Wang S., Huang J., Wang B., He Z., Liu B. Survivin-targeting miR-542-3p overcomes HER3 signaling-induced chemoresistance and enhances the antitumor activity of paclitaxel against HER2-overexpressing breast cancer // Cancer Lett. - 2018. - Vol. 420. - P. 97-108.

165 Si W., Shen J., Du C., Chen D., Gu X., Li C., Yao M., Pan J., Cheng J., Jiang D., Xu L., Bao C., Fu P., Fan W. A miR-20a/MAPK1/c-Myc regulatory feedback loop regulates breast carcinogenesis and chemoresistance // Cell Death Differ. - 2018. - Vol. 25, № 2. - P. 406-420.

166 Garzon R., Calin G.A., Croce C.M. MicroRNAs in Cancer // Annu Rev Med. - 2009. - Vol. 60. - P. 167-179.

167 Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer // Nat Rev Cancer. - 2006. - Vol. 6. - P. 259-269.

168 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, № 7. - P. 2257-2261.

169 Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R., Golub T.R. MicroRNA expression profiles classify human cancers // Nature. - 2005. - Vol. 435, № 7043. - P. 834-838.

170 Wang J., Zhang K.Y., Liu S.M., Sen S. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer // Molecules. - 2014. - Vol. 19. - P. 1912-1938.

171 Wang W., Luo Y.P. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential // Science B. - 2015. - Vol. 16. - P. 18-31.

172 Zhou X., Marian C., Makambi K.H., Kosti O., Kallakury B.V., Loffredo C.A., Zheng Y. L. MicroRNA-9 as potential biomarker for breast cancer local recurrence and tumor estrogen receptor status // PloS one. - 2012. - Vol. 7. - P. e39011.

173 Mohammadi-Yeganeh S., Mansouri A., Paryan M. Targeting Of miR-9/NOTCH1 Interaction Reduces Metastatic Behavior in Triple-negative Breast Cancer // Chemical biology & drug design. - 2015. - Vol. 86. - P. 1185-1191.

174 Liu X., Luo Z., Peng H., Jiang H., Xu L. Prognostic role of miR-9 expression in various human malignant neoplasms: a meta-analysis // OncoTargets and therapy. - 2016. - Vol. 9. - P. 3039.

175 Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact // J. Clin. Oncol. - 2009. - Vol. 27, № 34. - P. 5848-5856.

176 Yao C., Li H., Zhou C., Zhang L., Zou J., Guo Z. Multi-level reproducibility of signature hubs in human interactome for breast cancer metastasis // BMC Syst. Biol. - 2010. - Vol. 4. - P. 151.

177 Ivanovska I., Ball A.S., Diaz R.L., Magnus J.F., Kibukawa M., Schelter J.M., Kobayashi S.V., Lim L., Burchard J., Jackson A.L., Linsley P.S., Cleary M.A. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression // Mol. Cell. Biol. - 2008. - Vol. 28, № 7. - P. 2167-2174.

178 Zhang B., Liu X.X., He J.R., Zhou C.X., Guo M., He M., Li M.F., Chen G.Q., Zhao Q. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer // Carcinogenesis. - 2011. - Vol. 32, № 1. - P. 2-9.

179 Feldinger K., Generali D., Kramer-Marek G., Gijsen M., Ng T.B., Wong J.H., Strina C., Cappelletti M., Andreis D., Li J.L., Bridges E., Turley H., Leek R., Roxanis I., Capala J., Murphy G., Harris A.L., Kong A. ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer // Oncotarget. - 2014. - Vol. 5, № 16. - P. 6633-6646.

180 Gijsen M., King P., Perera T., Parker P.J., Harris A.L., Larijani B., Kong A. HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer // PLoS Biol. - 2010. - Vol. 8, № 12. - P. e1000563.

181 Kenny P.A., Bissell M.J. Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer // J Clin Invest. - 2007. - Vol. 117. - P. 337-345.

182 Canonici A., Gijsen M., Mullooly M., Bennett R., Bouguern N., Pedersen K., O'Brien N.A., Roxanis I., Li J.L., Bridge E., Finn R., Siamon D., McGowan P., Duffy M.J., O'Donovan N., Crown J., Kong A. Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer // Oncotarget. - 2013. - Vol. 4, № 10. - P. 1592-1605.

183 Osipo C., Patel P., Rizzo P., Clementz A.G., Hao L., Golde T.E., Miele L. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor // Oncogene. - 2008. - Vol. 27, № 37. - P. 5019-5032.

184 O'Shea C., McKie N., Buggy Y., Duggan C., Hill A.D., McDermott E., O'Higgins N., Duffy M.J. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer // Int J Cancer. - 2003. - Vol. 105, № 6. - P. 754-761.

185 McGowan P.M., Ryan B.M., Hill A.D., McDermott E., O'Higgins N., Duffy M.J. ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression // Clin Cancer Res. - 2007. - Vol. 13. - P. 2335-2343.

186 Feldinger K., Generali D., Kramer-Marek G., Gijsen M., Ng T.B., Wong J.H., Strina C., Cappelletti M., Andreis D., Li J.L., Bridges E., Turley H., Leek R., Roxanis I., Capala J., Murphy G., Harris A.L., Kong A. ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer // Oncotarget. - 2014. - Vol. 5, № 16. - P. 6633-6646.

187 Couch F.J., Nathanson K.L., Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention // Science. - 2014. - Vol. 343, № 6178. - P. 1466-1470.

188 Kuchenbaecker K.B., Hopper J.L., Barnes D.R., Phillips K.A., Mooij T.M., Roos-Blom M.J., Jervis S., van Leeuwen F.E., Milne R.L., Andrieu N., Goldgar D.E., Terry M.B., Rookus M.A., Easton D.F., Antoniou A.C., McGuffog L., Evans D.G., Barrowdale D., Frost D., Adlard J., Ong K.R., Izatt L., Tischkowitz M., Eeles R., Davidson R., Hodgson S., Ellis S., Nogues C., Lasset C., Stoppa-Lyonnet D., Fricker J.P., Faivre L., Berthet P., Hooning M.J., van der Kolk L.E., Kets C.M., Adank M.A., John E.M., Chung W.K., Andrulis I.L., Southey M., Daly M.B., Buys S.S., Osorio A., Engel C., Kast K., Schmutzler R.K., Caldes T., Jakubowska A., Simard J., Friedlander M.L., McLachlan S.A., Machackova E., Foretova L., Tan Y.Y., Singer C.F., Olah E., Gerdes A.M., Arver B., Olsson H. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers // J Am Med Assoc. - 2017. - Vol. 317, № 23. - P. 2402-2416.

189 Roskoski R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs // Pharmacol Res. - 2016. - Vol. 107. - P. 249-275.

190 Hosford S.R., Miller T.W. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways // Pharmgenom Pers Med. - 2014. - Vol. 7. - P. 203-215.

191 Piletz J.E., Deleersnijder W., Roth B.L., Ernsberger P., Zhu H., Ziegler D. IRAS splice variants // Ann N Y Acad Sci. - 2003. - Vol. 1009. - P. 419-426.

192 Alahari S.K., Lee J.W., Juliano R.L. Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration // J Cell Biol. - 2000. - Vol. 151. - P. 1141-1154.

193 Baranwal S., Wang Y., Rathinam R., Lee J., Jin L., McGoey R., Pylayeva Y., Giancotti F., Blobe G.C., Alahari S.K. Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer // J Natl Cancer Inst. - 2011. - Vol. 103, № 20. - P. 1513-1528.

194 Ostrow K.L., Hoque M.O., Loyo M., Brait M., Greenberg A., Siegfried J.M., Grandis J.R., Gaither Davis A., Bigbee W.L., Rom W., Sidransky D. Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by

quantitative methylation-specific PCR // Clin Cancer Res. - 2010. - Vol. 16, № 13. - P. 3463-3472.

195 Lei X., Shi F., Basu D., Huq A., Routhier S., Day R., Jin W. Proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity // J Biol Chem. - 2011. - Vol. 286, № 18. - P. 15747-15756.

196 Zhu P., Goh Y.Y., Chin H.F., Kersten S., Tan N.S. Angiopoietin-like 4: a decade of research // Biosci Rep. - 2012. - Vol. 32. - P. 211-219.

197 Tan M.J., Teo Z., Sng M.K., Zhu P., Tan N.S. Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer // Mol Cancer Res. - 2012. - Vol. 10. - P. 677-688.

198 Padua D., Zhang X.H., Wang Q., Nadal C., Gerald W.L., Gomis R.R., Massagué J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4 // Cell. - 2008. - Vol. 133, № 1. - P. 66-77.

199 Bai L., Wang F., Zhang D.S., Li C., Jin Y., Wang D.S., Chen D.L., Qiu M.Z., Luo H.Y., Wang Z.Q., Li Y.H., Wang F.H., Xu R.H. A plasma cytokine and angiogenic factor (CAF) analysis for selection of bevacizumab therapy in patients with metastatic colorectal cancer // Sci Rep. - 2015. - Vol. 5. - P. 17717.

200 Lan Q., Cao M., Kollipara R.K., Rosa J.B., Kittler R., Jiang H. FoxA transcription factor Fork head maintains the intestinal stem/progenitor cell identities in Drosophila // Dev Biol. - 2018. - Vol. 433. - P. 324-343.

201 Fournier M., Bourriquen G., Lamaze F.C., Cote M.C., Fournier E., Joly-Beauparlant C., Caron V., Gobeil S., Droit A., Bilodeau S. FOXA and master transcription factors recruit Mediator and Cohesin to the core transcriptional regulatory circuitry of cancer cells // Sci Rep. - 2016. - Vol. 6. - P. 34962.

202 Schrijver W., Schuurman K., van Rossum A., Droog M., Jeronimo C., Salta S., Henrique R., Wesseling J., Moelans C., Linn S.C., van den Heuvel M., van Diest P., Zwart W. FOXA1 levels are decreased in pleural breast cancer metastases after adjuvant endocrine therapy, and this is associated with poor outcome // Mol Oncol. -2018. - Vol. 12, № 11. - P. 1884-1894.

203 Wang H., Meyer C.A., Fei T., Wang G., Zhang F., Liu X.S. A systematic approach identifies FOXA1 as a key factor in the loss of epithelial traits during the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer // BMC Genomics. - 2013. - Vol. 14. - P. 680

204 Fusco A., Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer // Nat. Rev. Cancer. - 2007. - Vol. 7. - P. 899-910.

205 Hammond S.M., Sharpless N.E. HMGA2, microRNAs, and stem cell aging // Cell. - 2008. - Vol. 135. - P. 1013-1016.

206 Li A.Y., Boo L.M., Wang S.Y., Lin H.H., Wang C.C., Yen Y., Chen B.P., Chen D.J., Ann D.K. Suppression of nonhomologous end joining repair by overexpression of HMGA2 // Cancer Res. - 2009. - Vol. 69. - P. 5699-5706.

207 Summer H., Li O., Bao Q., Zhan L., Peter S., Sathiyanathan P., Henderson D., Klonisch T., Goodman S.D., Dröge P. HMGA2 exhibits dRP/AP site cleavage activity and protects cancer cells from DNAdamage-induced

cytotoxicity during chemotherapy // Nucleic Acids Res. - 2009. - Vol. 37. - P. 4371-4384.

208 Singh I., Ozturk N., Cordero J., Mehta A., Hasan D., Cosentino C., Sebastian C., Krüger M., Looso M., Carraro G., Bellusci S., Seeger W., Braun T., Mostoslavsky R., Barreto G. High mobility group protein-mediated transcription requires DNA damage marker gamma-H2AX // Cell Res. - 2015.- Vol. 25, № 7. - P. 837-850.

209 Wend P., Runke S., Wend K., Anchondo B., Yesayan M., Jardon M., Hardie N., Loddenkemper C., Ulasov I., Lesniak M.S., Wolsky R., Bentolila L.A., Grant S.G., Elashoff D., Lehr S., Latimer J.J., Bose S., Sattar H., Krum S.A., Miranda-Carboni G.A. WNT10B/beta-catenin signalling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer // EMBO Mol. Med. - 2013. - Vol. 5, № 2. - P. 264-279.

210 Li Y., Peng L., Seto E. Histone deacetylase 10 regulates the cell cycle G2/M phase transition via a novel Let-7-HMGA2-Cyclin A2 pathway // Mol. Cell. Biol. - 2015. - Vol. 35. - P. 3547-3565.

211 Narita M., Narita M., Krizhanovsky V., Nuñez S., Chicas A., Hearn S.A., Myers M.P., Lowe S.W. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation // Cell. - 2006. - Vol. 126. - P. 503-514.

212 Wu J., Liu Z., Shao C., Gong Y., Hernando E., Lee P., Narita M., Muller W., Liu J., Wei J.J. HMGA2 overexpressioninduced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes // Cancer Res. - 2011. - Vol. 71, № 2. - P. 349-359.

213 Tan E.J., Kahata K., Idas O., Thuault S., Heldin C.H., Moustakas A. The high mobility group A2 protein epigenetically silences the Cdh1 gene during epithelial-to-mesenchymal transition // Nucleic Acids Res. - 2015. - Vol. 43. - P. 162-178.

214 Morishita A., Zaidi M.R., Mitoro A., Sankarasharma D., Szabolcs M., Okada Y., D'Armiento J., Chada K. HMGA2 is a driver of tumor metastasis // Cancer Res. - 2013. - Vol. 73. - P. 4289-4299.

215 Li A.Y., Lin H.H., Kuo C.Y., Shih H.M., Wang C.C., Yen Y., Ann D.K. High-mobility group A2 protein modulates hTERT transcription to promote tumorigenesis // Mol. Cell. Biol. - 2011. - Vol. 31, № 13. - P. 2605-2617.

216 Wang X., Liu X., Li A.Y., Chen L., Lai L., Lin H.H., Hu S., Yao L., Peng J., Loera S., Xue L., Zhou B., Zhou L., Zheng S., Chu P., Zhang S., Ann D.K., Yen Y. Overexpression of HMGA2 promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers // Clin. Cancer Res. - 2011. - Vol. 17, № 8. - P. 2570-2580.

217 Piscuoglio S., Zlobec I., Pallante P., Sepe R., Esposito F., Zimmermann A., Diamantis I., Terracciano L., Fusco A., Karamitopoulou E. HMGA1 and HMGA2 protein expression correlates with advanced tumour grade and lymph node metastasis in pancreatic adenocarcinoma // Histopathology. - 2012. - Vol. 60, № 3. - P. 397-404.

218 Chang K.P., Lin S.J., Liu S.C., Yi J.S., Chien K.Y., Chi L.M., Kao H.K., Liang Y., Lin Y.T., Chang Y.S., Yu J.S. Low-molecular-mass secretome profiling

identifies HMGA2 and MIF as prognostic biomarkers for oral cavity squamous cell carcinoma // Sci. Rep. - 2015. - Vol. 5. - P. 11689.

219 Saâda-Bouzid E., Burel-Vandenbos F., Ranchère-Vince D., Birtwisle-Peyrottes I., Chetaille B., Bouvier C., Château M.C., Peoc'h M., Battistella M., Bazin A., Gal J., Michiels J.F., Coindre J.M., Pedeutour F., Bianchini L. Prognostic value of HMGA2, CDK4, and JUN amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas // Mod. Pathol. - 2015. - Vol. 28.-, № 11. - P. 1404-1414.

220 Sun M., Gomes S., Chen P., Frankenberger C.A., Sankarasharma D., Chung C.H., Chada K.K., Rosner M.R. RKIP and HMGA2 regulate breast tumor survival and metastasis through lysyl oxidase and syndecan-2 // Oncogene. - 2014. - Vol. 33, № 27. - P. 3528-3537.

221 Boo L.M., Lin H.H., Chung V., Zhou B., Louie S.G., O'Reilly M.A., Yen Y., Ann D.K. High mobility group A2 potentiates genotoxic stress in part through the modulation of basal and DNA damage-dependent phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase activation // Cancer Res. - 2005. - Vol. 65, № 15. - P. 6622-6630.

222 Rhodes D.R., Yu J., Shanker K., Deshpande N., Varambally R., Ghosh D., Barrette T., Pandey A., Chinnaiyan A.M. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2004. - Vol. 101. - P. 9309-9314.

223 Vervoort S., van Boxtel R., Coffer P.J. The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe? // Oncogene. - 2013. - Vol. 32. - P. 3397-3409.

224 Foronda M., Martınez P., Schoeftner S., Gomez-Lopez G., Schneider R., Flores J.M., Pisano D.G., Blasco M.A. Sox4 links tumor suppression to accelerated aging in mice by modulating stem cell activation // Cell Rep. - 2014. - Vol. 8. - P. 487-500.

225 Shin M.S., Fredrickson T.N., Hartley J.W., Suzuki T., Agaki K., Morse H.C. High-throughput retroviral tagging for identification of genes involved in initiation and progression of mouse splenic marginal zone lymphomas // Cancer Res. - 2004. - Vol. 64. - P. 4419-4427.

226 Tiwari N., Tiwari V.K., Waldmeier L., Balwierz P.J., Arnold P., Pachkov M., Meyer-Schaller N., Schubeler D., van Nimwegen E., Christofori G. Sox4 is a master regulator of Epithelial-Mesenchymal transition by controlling Ezh2 expression and epigenetic reprogramming // Cancer Cell. - 2013. - Vol. 23. - P. 768-783.

227 Liu P., Ramachandran S., Seyed M.A., Scharer C.D., Laycock N., Dalton W.B., Williams H., Karanam S., Datta M.W., Jaye D.L., Moreno C.S. Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells // Cancer Res. - 2006. - Vol. 66, № 8. - P. 4011-4019.

228 Ikushima H., Todo T., Ino Y., Takahashi M., Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors // Cell Stem Cell. - 2009. - Vol. 5, № 5. - P. 504-514.

229 Kuwahara M., Yamashita M., Shinoda K., Tofukuji S., Onodera A., Shinnakasu R., Motohashi S., Hosokawa H., Tumes D., Iwamura C., Lefebvre V., Nakayama T. The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- and suppresses TH2 differentiation // Nat. Immunol. - 2012. - Vol. 13, № 8. - P. 778-786..

230 Ruebel K.H., Leontovich A.A., Tanizaki Y., Jin L., Stilling G.A., Zhang S., Coonse K., Scheithauer B.W., Lombardero M., Kovacs K., Lloyd R.V. Effects of TGFbeta1 on gene expression in the HP75 human pituitary tumor cell line identified by gene expression profiling // Endocrine. - 2008. - Vol. 33, № 1. - P. 62-76.

231 Vervoort S., Lourenco A.R., van Boxtel R., Coffer P.J. SOX4 mediates TGF--Induced expression of mesenchymal markers during mammary cell epithelial to mesenchymal transition // PLoS One. - 2013. - Vol. 8. - P. e53238.

232 Atchley D.P., Albarracin C.T., Lopez A., Valero V., Amos C.I., Gonzalez-Angulo A.M., Hortobagyi G.N., Arun B.K. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. - 2008. - Vol. 26, № 26. - P. 4282-4288.

233 Comen E., Davids M., Kirchhoff T., Hudis C., Offit K., Robson M. Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to "triple-negative" breast cancer in Ashkenazi Women // Breast cancer research and treatment. - 2011. - Vol. 129. - P. 185-190.

234 Robertson L., Hanson H., Seal S., Warren-Perry M., Hughes D., Howell I., Turnbull C., Houlston R., Shanley S., Butler S., Evans D.G., Ross G., Eccles D., Tutt A., Rahman N. BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years // British journal of cancer. - 2012. - Vol. 106, № 6. - P. 1234-1238.

235 Gonzalez-Angulo A.M., Timms K.M., Liu S., Chen H., Litton J.K., Potter J., Lanchbury J.S., Stemke-Hale K., Hennessy B.T., Arun B.K., Hortobagyi G.N., Do K.A., Mills G.B., Meric-Bernstam F. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer // 16 Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. - 2011. - Vol. 17, № 5. - P. 1082-1089.

236 Sharma P., Klemp J.R., Kimler B.F., Mahnken J.D., Geier L.J., Khan Q.J., Elia M., Connor C.S., McGinness M.K., Mammen J.M., Wagner J.L., Ward C., Ranallo L., Knight C.J., Stecklein S.R., Jensen R.A., Fabian C.J., Godwin A.K. Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing // Breast cancer research and treatment. - 2014. - Vol. 145, № 3. - P. 707-714.

237 Andrés R., Pajares I., Balmaña J., Llort G., Ramón Y., Cajal T., Chirivella I., Aguirre E., Robles L., Lastra E., Pérez-Segura P., Bosch N., Yagüe C., Lerma E., Godino J., Miramar M.D., Moros M., Astier P., Saez B., Vidal M.J., Arcusa A., Ramón y Cajal S., Calvo M.T., Tres A. Association of BRCA1 germline mutations in young onset triple-negative breast cancer (TNBC) // Clin Transl Oncol. - 2014. - Vol. 16, № 3. - P. 280-284.

238 Evans D.G., Howell A., Ward D., Lalloo F., Jones J.L., Eccles D.M. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer // J Med Genet. - 2011. - Vol. 48. - P. 520-522.

239 Young S.R., Pilarski R.T., Donenberg T., Shapiro C., Hammond L.S., Miller J., Brooks K.A., Cohen S., Tenenholz B., Desai D., Zandvakili I., Royer R., Li S., Narod S.A. The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer // BMC cancer. - 2009. - Vol. 9. - P. 86.

240 Couch F.J., Hart S.N., Sharma P., Toland A.E., Wang X., Miron P., Olson J.E., Godwin A.K., Pankratz V.S., Olswold C., Slettedahl S., Hallberg E., Guidugli L., Davila J.I., Beckmann M.W., Janni W., Rack B., Ekici A.B., Slamon D.J., Konstantopoulou I., Fostira F., Vratimos A., Fountzilas G., Pelttari L.M., Tapper W.J., Durcan L., Cross S.S., Pilarski R., Shapiro C.L., Klemp J., Yao S., Garber J., Cox A., Brauch H., Ambrosone C., Nevanlinna H., Yannoukakos D., Slager S.L., Vachon C.M., Eccles D.M., Fasching P.A. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. - 2015. - Vol. 33, № 4. - P. 304-311. doi: 10.1200/JCO.2014.57.1414.

241 Zhao S., Mei Y., Wang Y., Zhu J., Zheng G., Ma R. Levels of CEA, CA153, CA199, CA724 and AFP in nipple discharge of breast cancer patients // Int J Clin Exp Med. - 2015. - Vol. 8. - P. 20837-20844.

242 Ilantzis C., DeMarte L., Screaton R.A., Stanners C.P. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation // Neoplasia. - 2002. - Vol. 4, № 2. - P. 151-163.

243 Ordonez C., Screaton R.A., Ilantzis C., Stanners C.P. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis // Cancer Research. - 2000. - Vol. 60, № 13. - P. 3419-3424.

244 Camacho-Leal P., Zhai A.B., Stanners, C.P. A coclustering model involving alpha5beta1 integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA) // Journal of Cell Physiology. - 2007. - Vol. 211, № 3. - P. 791-802.

245 Putoczki T., Ernst M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer // J Leukoc Biol. - 2010. - Vol. 88. - P. 1109-1117.

246 Garbers C., Hermanns H.M., Schaper F., Müller-Newen G., Grötzinger J., Rose-John S., Scheller J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines // Cytokine & growth factor reviews. - 2012. - Vol. 23. - P. 85-97.

247 Yu H., Pardoll D., Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 // Nature Reviews Cancer. - 2009. - Vol. 9. - P. 98-809.

248 Bloom G.S. Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis // JAMA Neurol. - 2014. - Vol. 71. - P. 505-508.

249 Pusztai L. Markers predicting clinical benefit in breast cancer from microtubule-targeting agents // Ann Oncol. - 2007. - Vol. 18. - P. xii15-20.

250 Hristodorov D., Mladenov R., Pardo A., Pham A.T., Huhn M., Fischer R., Thepen T., Barth S. Microtubule-associated protein tau facilitates the targeted

killing of proliferating cancer cells in vitro and in a xenograft mouse tumour model in vivo // Br J Cancer. - 2013. - Vol. 109. - P. 1570-1578.

251 Wu H., Huang M., Lu M., Zhu W., Shu Y., Cao P., Liu P. Regulation of microtubule-associated protein tau (MAPT) by miR-34c-5p determines the chemosensitivity of gastric cancer to paclitaxel // Cancer Chemother Pharmacol. - 2013. - Vol. 71. - P. 1159-1171.

252 Bonneau C., Gurard-Levin Z.A., Andre F., Pusztai L., Rouzier R. Predictive and Prognostic Value of the TauProtein in Breast Cancer // Anticancer Res. - 2015. - Vol. 35. - P. 5179-5184.

253 Baquero M.T., Lostritto K., Gustavson M.D., Bassi K.A., Appia F., Camp R.L., Molinaro A.M., Harris L.N., Rimm D.L. Evaluation of prognostic and predictive value of microtubule associated protein tau in two independent cohorts // Breast Cancer Res. - 2011. - Vol. 13. - P. R85.

254 Andre F., Hatzis C., Anderson K., Sotiriou C., Mazouni C., Mejia J., Wang B., Hortobagyi G.N., Symmans W.F., Pusztai L. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer // Clin Cancer Res. - 2007. - Vol. 13. - P. 2061-2067.

255 Belletti B., Baldassarre G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer // Expert Opin. Ther. Targets. - 2011. - Vol. 15. - P. 1249-1266.

256 Byrne F.L., Yang L., Phillips P.A., Hansford L.M., Fletcher J.I., Ormandy C.J., McCarroll J.A., Kavallaris M. RNAi-mediated stathmin suppression reduces lung metastasis in an orthotopic neuroblastoma mouse model // Oncogene. - 2014. - Vol. 33. - P. 882-890.

257 Chen P.W., Lin S.J., Tsai S.C., Lin J.H., Chen M.R., Wang J.T., Lee C.P., Tsai C.H. Regulation of microtubule dynamics through phosphorylation on stathmin by Epstein-Barr virus kinase BGLF4 // J. Biol. Chem. - 2010. - Vol. 285. - P. 10053-10063.

258 Manna T., Thrower D.A., Honnappa S., Steinmetz M.O., Wilson L., Regulation of microtubule dynamic instability in vitro by differentially phosphorylated stathmin // J. Biol. Chem. - 2009. - Vol. 284. - P. 15640-15649.

259 Wik E., Birkeland E., Trovik J., Werner H.M., Hoivik E.A., Mjos S., Krakstad C., Kusonmano K., Mauland K., Stefansson I.M., Holst F., Petersen K., Oyan A.M., Simon R., Kalland K.H., Ricketts W., Akslen L.A., Salvesen H.B. High phospho-Stathmin(Serine38) expression identifies aggressive endometrial cancer and suggests an association with PI3K inhibition // Clin. Cancer Res. - 2013. - Vol. 19, № 9. - P. 2331-2341.

260 Londin E., Loher P., Telonis A.G., Quann K., Clark P., Jing Y., Hatzimichael E., Kirino Y., Honda S., Lally M., Ramratnam B., Comstock C.E., Knudsen K.E., Gomella L., Spaeth G.L., Hark L., Katz L.J., Witkiewicz A., Rostami A., Jimenez S.A., Hollingsworth M.A., Yeh J.J., Shaw C.A., McKenzie S.E., Bray P., Nelson P.T., Zupo S., Van Roosbroeck K., Keating M.J., Calin G.A., Yeo C., Jimbo M., Cozzitorto J., Brody J.R., Delgrosso K., Mattick J.S., Fortina P., Rigoutsos I. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of

numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // PNAS USA. - 2015. - Vol. 112, № 10. - P. 1106-1115.

261 Ivashchenko A., Pyrkova A., Niyazova R. A method for clustering of miRNA sequences using fragmented programming // Bioinformation. - 2016. - Vol. 12, № 1. - P. 15-18.

262 Kool E.T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. - 2001. - Vol. 30. - P. 1-22.

263 Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson- Crick base pairs and their associated isostericity matrices // Nucleic Acids Research. - 2002. - Vol. 30, №. 16. - P. 3497-3531.

264 Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // Genome Res. - 2009. - Vol. 19. - P. 92-105.

265 Atambayeva S., Niyazova R., Ivashchenko A., Pyrkova A., Pinsky I., Akimniyazova A., Labeit S. The Binding Sites of miR-619-5p in the mRNAs of Human and Orthologous Genes // BMC Genomics. - 2017. - Vol. 18. - P. 428. doi: 10.1186/s12864-017-3811-6.

266 Kondybayeva A.M., Akimniyazova A.N., Kamenova S.U., Ivashchenko A.T. The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of ZFHX3 gene and its orthologs // Vavilov journal of Genetics and Breeding. - 2018. - Vol. 22. - P. 438-444.

267 Aisina D.E., Ivashchenko A.T., Niyazova R.E., Atambayeva S.A., Imyanitov E.N. Characteristics of interaction of miRNA with mRNA of breast cancer candidate genes // International Journal of Biology and Chemistry. - 2018. - Vol. 11, № 1. - P. 18-32.

268 Айсина Д.Е., Жабаева А.А., Даулетова А.А. Взаимодействие miRNA с mRNA гена *E2F1* // Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Мир науки». - 2017. - С. 85.

269 Айсина Д.Е., Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А. Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов E2F // Известия НАН РК, серия биологическая и медицинская. - 2017. - Vol. 2, № 320. - С. 131-137.

270 Айсина Д., Каби К., Ким А. Взаимодействие miRNA с mRNA ортологичных генов *E2F2 //* Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Мир науки». - 2018. - С. 186.

271 Aisina D.E., Niyazova R.E., Imyanitov E.N., Ivashchenko A.T. Features of miRNA binding with mRNA of E2F family genes // International forum, Biotechnology: state of the art and perspectives. - 2018. - P.528-529.

272 Aisina D.E., Niyazova R.E., Atambayeva S.A., Imyanitov E.N., Ivashchenko A.T. Characteristics of interaction of miRNA with mRNA of E2F transcription factors family genes // International Journal of Biology and Chemistry. - 2017. - Vol. 10, № 2. - P. 10-18.

273 Айсина Д.Е., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т. Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA гена *E2F3 //* Материалы

международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биотехнологии, экологии и физико-химической биологии». - 2017. - С.15.

274 Айсина Д.Е., Атамбаева Ш.А. Иващенко А.Т. Взаимодействие miRNA с mRNA гена *E2F3* // IX Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития. - 2017. - С. 380-381.

275 Aisina D.E., Imyanitov E.N., Ivashchenko A.T. Characteristics of miR-1322 interaction with mRNA of genes involved in the development of breast cancer // Experimental biology of al-Farabi Kazakh National University. - 2017. - Vol. 3, № 72. - P. 30-41.

276 Aisina D.E., Ivashchenko A.T. Binding sites of mir-1322 in mRNA of orthologic *ARID3B* genes // II Всероссийская конференция ActaNaturae, с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике». -2017. - Vol. 9, №1. - С. 92.

277 Aisina D.Ye. Binding sites of miR-1322 in mRNA of orthologic *SMARCA2* genes // Сборник научных статей по итогам международной научно-практической конференции «Наука нового времени: от идеи к результату», издательство «КультИнформПресс». - 2017. - С.15-17.

278 Niyazova R., Berillo O., Atambayeva Sh., Pyrkova A., Alybaeva A., Ivashchenko A. miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes // Biomed Research International. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-7.

279 Aisina D.E., Akimniyazova A.N. Features of multiple binding sites oF miR-1322 with mRNA of *NCOA3, NCOA6* and *NCOR2* genes responsible for oncogenesis // International conference “Clinical proteomics. Postgenome medicine”. - 2017. - P. 83-84.

280 Aisina D.E., Niyazova R., Atambayeva Sh., Imyanitov E., Ivashchenko A. Features of miRNA binding with mRNA of candidate genes of breast cancer subtypes // Experimental biology of al-Farabi Kazakh National University. - 2017. - Vol. 4, № 73. - P. 52-66.

281 Aisina D.E., Niyazova R.E., Atambayeva S.A., Imyanitov E.N., Ivashchenko A.T. Characteristics of miRNA interaction with 5'UTR, CDS, 3'UTR mRNA candidate genes of breast cancer subtypes // Experimental biology of al-Farabi Kazakh National University. - 2018. - Vol. 2, № 75. - P. 30-48.

282 Aisina D.E. Cluster organization of miRNA with mRNA genes HER2 subtype breast cancer // International congress “Biotechnology-state of the art and perspectives”. - 2019. - P. 343-345.

283 Aisina D. E., Niyazova R. E., Atambayeva Sh. A., Imyanitov E. N., Ivashchenko A. T. Clusters of miRNAs binding sites in 3′UTR mRNA of breast cancer candidate genes // Известия НАН РК, серия биологическая и медицинская. - 2019. - Vol. 3, № 333. - С. 20-26.

284 Aisina D., Niyazova R., Atambayeva Sh., Ivashchenko A. miRNA interaction with 5’UTR, CDS, 3’UTR mRNA candidate genes of breast cancer subtypes // The 11th International Conference, BGRS/SB-2018, Integrative Bioinformatics and Systems Biology, WIBSB-2018. - 2018. - p.13.

285 Aisina D.E., Ivashchenko A.T. Prediction of clusters of miRNA binding sites in mRNA candidate genes of luminal A and B subtypes breast cancer // 9-ая

международная Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии «MCCMB'19». - 2019. - С. 1-4.

286 Belot M.P., Nadéri K., Mille C., Boëlle P.Y., Benachi A., Bougnères P., Fradin D. Role of DNA methylation at the placental RTL1 gene locus in type 1 diabetes // Pediatr Diabetes. - 2017. - Vol. 18, № 3. - P. 178-187.

287 Wang J., Li Z., Liu B., Chen G., Shao N., Ying X., Wang Y. Systematic study of cis-antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target *PPP2CA* in human cells // RNA. - 2016. - Vol. 22, № 1. - P. 87-95.

288 Yurikova O.Yu., Aisina D.E., Niyazova R.E., Atambayeva Sh.A., Labeit S., Ivashchenko A.T. The Interaction of miRNA-5p and miRNA-3p with the mRNAs of Orthologous Genes // Molecular biology. - 2019. - Vol. 53, № 4. - P. 612-623.

289 Юрикова О.Ю., Айсина Д.Е., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А., Лабейт З., Иващенко А.Т. Взаимодействие miR-5p и miR-3p с мРНК ортологичных генов // Молекулярная биология. - 2019. - Том 53, №4. - С. 692-704.

290 Aisina D.E. Candidate genes of cancer as a target of miRNA host genes // International Conference “Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine”. - 2018. - P. 6-7.