АННОТАЦИЯ

Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности «6D074000 – Наноматериалы и нанотехнологии»
Акимниязовой Айгуль Нурланкызы
на тему «Взаимодействие miRNA с mRNA кандидатных генов рака органов желудочно-кишечного тракта».

Общая характеристика работы. Работа посвящена изучению характеристик взаимодействия miRNA (**m**RNA-**i**nhibitory **RNA**) с mRNA генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта, и поиску маркеров на основе ассоциаций miRNA и кандидатных генов для ранней диагностики рака органов желудочно-кишечного тракта. Все объекты проведенных исследований являются наноразмерными и процессы взаимодействия этих наномолекул являются нанопроцессами (нанотехнологиями).

Актуальность темы исследования.

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертей в мире. В 2020 году в мире зафиксировано примерно 19,3 миллиона новых случаев онкозаболеваний и почти 10 миллионов случаев смерти от рака. Специалисты из Международного агентства по изучению рака зафиксировали большое количество смертей от колоректального рака (9,4%), рака желудка (7,7%) и пищевода (5,5%). Несмотря на успехи в изучении патогенеза онкологических заболеваний и значительные усилия по созданию и совершенствованию методов диагностики и лечения, заболеваемость и смертность от рака органов желудочно-кишечного тракта продолжает оставаться на относительно высоком уровне как в развивающихся, так и в развитых странах. Поиск новых биомаркеров, которые охватывают различные аспекты заболеваний, может обеспечить выбор подходящих методов лечения и лучший мониторинг пациентов с раком органов желудочно-кишечного тракта. Среди нескольких биомаркеров тканеспецифичные и циркулирующие наномолекулы miRNA оказались перспективными кандидатами в диагностике рака органов желудочно-кишечного тракта. miRNA представляют собой наноразмерные, некодирующие молекулы RNA длиной 6-9 нм. Наномолекулы miRNA регулируют экспрессию генов и обнаруживаются в крови, плазме/сыворотке, моче и других жидкостях организма в очень стабильной форме. Они действуют как пост-транскрипционные регуляторы экспрессии генов. Показано, что отдельные наномолекулы miRNA регулируют экспрессию нескольких генов. Напротив, экспрессия отдельных генов может регулироваться многими наномолекулами miRNA. С момента их открытия более 20 лет назад наномолекулы miRNA были идентифицированы как ключевые регуляторы сложных нанобиологических процессов, связанных с множеством онкологических патологий. Изменение экспрессии наномолекул miRNA стало важной отличительной чертой рака. Различные наномолекулы miRNA могут функционировать в качестве онкосупрессоров и онкогенов, и нарушение регуляции определенных наномолекул miRNA может

способствовать развитию рака. Наномолекулы miRNA могут потенциально изменять сложные молекулярные процессы роста клеток, клеточный цикла, апоптоза и инвазии. Участие наномолекул miRNA в онкологических заболеваниях и их функция побудили исследовать miRNA при раке органов желудочно-кишечного тракта. Значительные успехи могут быть достигнуты в молекулярной медицине за счет внедрения новых молекулярно-генетических и компьютерных технологий в изучение наномолекул miRNA и их генов-мишеней у человека. Необходимость данной работы основана на определении ассоциаций наномолекул miRNA и mRNA кандидатных генов, как новых молекулярных маркеров рака желудочно-кишечного тракта.

Цель работы: Выявить количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта.

Задачи исследования:

1. Создать базы данных для наномолекул miRNA и кандидатных генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта.
2. Изучить характеристики взаимодействия наномолекул miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака пищевода.
3. Изучить характеристики взаимодействия наномолекул miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака желудка.
4. Изучить характеристики взаимодействия наномолекул miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака тонкой кишки.
5. Изучить характеристики взаимодействия наномолекул miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии колоректального рака.
6. Установить специфические ассоциации наномолекул miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта.

Объекты исследования: нуклеотидные последовательности 6274 наномолекул miRNA и генов человека, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта.

Предмет исследования: Характеристики взаимодействий наномолекул miRNA и mRNA кандидатных генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта.

Методы исследования. Методы компьютерного анализа и поиска сайтов связывания наномолекул miRNA с mRNA генов на основе моделирования водородных связей с помощью программы MirTarget.

Научная новизна исследования. Впервые установлены количественные характеристики взаимодействия 6274 наномолекул miRNA с mRNA кандидатных генов, связанных с развитием рака органов желудочно-кишечного тракта. Предложены специфические ассоциации наномолекул miRNA и их генов-мишеней для разработки основ диагностики этих заболеваний. Найдены сайты связывания наномолекул miRNA в mRNA с величиной свободной энергии взаимодействия равной или более -130 кДж/моль и сайты связывания с кластерной организацией. Выявлены полностью комплементарные взаимодействия miRNA с 5'UTR, CDS и 3’UTR mRNA кандидатных генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-

кишечного тракта.

Теоретическая значимость работы. Теоретическая значимость исследования заключается в определении количественных характеристик взаимодействия наномолекул miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта. Эти данные позволяют на новом научном уровне совершенствовать раннюю диагностику онкогенеза, позволяющую выявить больных с различными типами и субтипами рака органов желудочно-кишечного тракта.

Практическая значимость исследования. Нахождение и использование ассоциаций наномолекул miRNA и генов-мишеней применимо к другим онкозаболеваниям. Предлагаемая методология будет важна для диагностики полигенных заболеваний, когда необходимо выявить гены наиболее ответственные за развитие болезни и селективно изменять их экспрессию. Применение компьютерных методов в поиске генов-мишеней для miRNA позволяет в тысячи раз ускорить и удешевить нахождение эффективных ассоциаций наномолекул miRNA и генов-мишеней. Одновременно эти методы позволяют учитывать побочные действия конкретной miRNA на все потенциально экспрессируемые гены генома человека. Получены два авторских свидетельства на вычислительные программы. Применяемый компьютерные методы позволят разработать тест-системы для ранней диагностики рака органов желудочно-кишечного тракта.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Созданные в формате для программы MirTarget база наномолекул miRNA человека и база по 372 кандидатным генам, связанных с развитием рака пищевода, желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника, может быть использована для разработки тест-систем для ранней диагностики этих заболеваний.
2. Геном человека содержит кандидатные гены рака органов желудочно-кишечного тракта, которые в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA имеют сайты связывания наномолекул miRNA с высокой комплементарностью нуклеотидов. Сайты связывания наноразмерных miRNA в CDS mRNA кандидатных генов, имеют высокую филогенетическую консервативность.
3. Большинство кандидатных генов рака органов желудочно-кишечного тракта являются мишенью одной или нескольких наномолекул miRNA, сайты связывания которых расположены в mRNA отдельно друг от друга. В mRNA других кандидатных генов сайты связывания наномолекул miRNA расположены с наложением нуклеотидных последовательностей, образуя кластеры сайтов связывания двух и более miRNA. Кластеры сайтов связывания наномолекул miRNA характеризуются компактностью их расположения и вызывают конкуренцию между наномолекулами miRNA поскольку их сайты связывания расположены с наложением нуклеотидов.
4. Количественные характеристики взаимодействия наномолекул miRNA с mRNA кандидатных генов-мишеней свидетельствуют о потенциально высокой зависимости экспрессии этих генов от концентрации miRNA и

mRNA. Они служат основой выбора эффективных ассоциаций наноразмерных miRNA и mRNA для диагностики рака органов желудочно-кишечного тракта.

Основные результаты исследований и выводы:

1. В формате для программы MirTarget была создана база кандидатных генов, связанных с развитием рака органов желудочно-кишечного тракта, состоящая из кандидатных генов: аденокарциномы пищевода - 38 генов, плоскоклеточной карциномы пищевода - 66 генов, рака желудка - 215 генов, рака тонкой кишки - 40 генов, колоректального рака - 135 генов. В формате для программы MirTarget создана база из 6274 нуклеотидных последовательностей наномолекул miRNA.

2. В генах, связанных с развитием рака пищевода, обнаружено 279 сайтов связывания для 184 miRNA, которые могут регулировать 32 из 38 кандидатных генов аденокарциномы пищевода. 246 miRNA образуют 321 сайт связывания в mRNA 53 из 66 генов-кандидатов плоскоклеточной карциномы пищевода. Выделены ассоциации miRNA и mRNA, которые имеют свободную энергию взаимодействия, равную -130 кДж/моль и более, для рекомендации их в качестве маркеров для ранней диагностики рака пищевода.

3. На основе полученных характеристик взаимодействия 6274 miRNA с 5'UTR, CDS, 3'UTR mRNA 215 кандидатных генов рака желудка выделены ассоциации со значением средней свободной энергии взаимодействия равной -130 кДж/моль и выше. Обнаружено, что 153 из 215 mRNA генов-кандидатов, ответственных за развитие рака желудка, имеют высокое сродство с 309 miRNA. Выявлены сайты связывания miRNA в некоторых mRNA генов, образующие кластеры. Установлена высокая консервативность сайтов связывания miRNA в mRNA ортологичных генов *ARID1A, E2F1, TBC1D9, MAPK1, TERT* и *VEGFC*.

4. В генах, связанных с развитием рака тонкого кишечника, 211 miRNA имеют сайты связывания, которые могут с высокой эффективностью регулировать экспрессию 32 из 40 кандидатных генов. Выявлены полностью комплементарные взаимодействия miRNA с mRNA *ASXL1, GNAS* и *KRAS*. Были выделены ассоциации miRNA и mRNA, которые имеют свободную энергию взаимодействия, равную -130 кДж/моль и более, для рекомендации их в качестве маркеров для ранней диагностики рака тонкого кишечника.

5. В mRNA генов, связанных с развитием колоректального рака, идентифицировано 233 сайтов связывания для 165 miRNA в 5’UTR; 193 сайта связывания для 167 miRNA в CDS; 450 сайта связывания для 151 miRNA в 3’UTR. Предложены miR-619-5p, miR-6089, ID03208.5p-miR, ID00296.3p-miR, ID03332.3p-miR и семейство miR-548, которые можно использовать для диагностики колоректального рака.

6. Выявлены ассоциации miRNA с кандидатными генами рака органов желудочно-кишечного тракта: аденокарциномы пишевода – 18 ассоциаций, плоскоклеточной карциномы пищевода – 12 ассоциаций, рака желудка – 42 ассоциации, рака тонкой кишки – 20 ассоциаций, колоректального рака – 35 ассоциаций.

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 и обсуждены:

- 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 XX международной научно-практической конференции "Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования", Россия, 4 февраля 2019 г.;
- на международной научной конференции студентов и молодых учёных «Фараби алемі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан, 8-9 апреля 2019 г.;
- на международной конференции «9-ая Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии MCCMB'19», Москва, Россия, 27-30 июля 2019 г.;
- на 12 международной мультиконференции “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020)”, Новосибирск, Россия, 6-10 июля, 2020 г.;

Публикации и личный вклад автора. Основное содержание диссертации отражено в 13 печатных работах, в том числе 2 статьях в международных журналах, цитируемых в базах данных Web of Knowledge и Scopus; 5 статей из перечня Комитета по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан; 6 тезисов в материалах международных конференций. Автор самостоятельно провёл анализ данных литературы по теме исследования, экспериментальные исследования, анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации. Получено авторское свидетельство на программу MirTarSeq (miRNA target sequence - олигопептиды и олигонуклеотиды). Получен акт о внедрении результатов исследования в курс «"Омиксные" технологии в медицине и фармации» магистерской образовательной программы 7М101 "Здравоохранение".

Структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах и состоит из следующих разделов: обозначение и сокращение, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список использованных источников из 296 наименований; содержит 19 таблиц, 25 рисунков и 16 приложений.