

АННОТАЦИЯ

Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности «6D060700-Биология»

Мукушкиной Дины Дауренбековны

на тему «Структурно-функциональная организация сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда»

Общая характеристика работы. Настоящая работа посвящена изучению структурно-функциональной организации сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда и выявлению значимых ассоциаций miRNA и генов-мишеней для дальнейшего использования в ранней диагностике и терапии данных заболеваний.

Актуальность темы исследования.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. Ежегодно в результате инсультов и инфарктов умирают порядка 17,1 миллионов человек. Все чаще в последнее время данные заболевания диагностируются у молодых людей. Как было установлено многочисленными исследованиями, ССЗ развиваются в результате различных факторов риска. Некоторые из основных факторов риска не поддаются изменению, других факторов можно избежать путем изменения привычек и образа жизни. По прогнозам ВОЗ, к 2030 году около 25 миллионов человек будет умирать от ССЗ ежегодно. Показатель смертности в Республике Казахстан по причине болезней системы кровообращения почти в два раза выше, чем в европейских странах. За последние десять лет показатель заболеваемости ССЗ вырос в Казахстане в 1,7 раза. Практически каждый десятый казахстанец сегодня страдает ИБС, при этом среди умерших от нее - большая доля экономически активного населения в возрасте от 18 до 64 лет.

Несмотря на то, что современная клиническая медицина ориентирована преимущественно на использование лекарств, немедикаментозные методы лечения привлекают специалистов в области профилактики и лечения. Растет число исследований, подчеркивающих важность miRNAs (mRNA-inhibiting RNA) в патогенезе ССЗ.

miRNA это наноразмерные RNAs длиной от 19 до 27 нуклеотидов, способные регулировать экспрессию более 60% всех кодирующих белок генов человека. miRNA способны регулировать экспрессию генов на уровне трансляции путем связывания с mRNA гена-мишени. В геноме человека закодировано несколько тысяч miRNA, образующих обширную регуляторную сеть, которая задействована в самых разных сигнальных путях и клеточных процессах. Определение miRNA в крови пациентов может быть перспективным направлением для ранней диагностики таких клинических осложнений атеросклероза, как ишемический инсульт и инфаркт миокарда. В нескольких тысячах публикаций описывается изменение концентрации

miRNA при различных заболеваниях и изменение экспрессии белок кодирующих генов. В таких экспериментах, как правило, устанавливаются корреляции между изменениями экспрессии от одной до десятков miRNA и предполагаемых генов-мишеней. Поэтому расширенное и точное понимание функции miRNA в генных регуляторных сетях, связанных с риском развития ССЗ, позволит выявить новые механизмы развития заболеваний, прогнозировать развитие заболеваний и выработать персонализированные терапевтические стратегии.

Объект исследования: нуклеотидные последовательности miRNA и кандидатных генов атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.

Предмет исследования: структурно-функциональная организация сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.

Цель работы: установление структурно-функциональной организации сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов атеросклероза, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и определение количественных характеристик взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов этих заболеваний.

Задачи исследования:

1. Создать базы кандидатных генов инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца и атеросклероза, на основе опубликованных научных литературных источников в данной области исследований.
2. Выявить особенности структурно-функциональной организации сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов атеросклероза.
3. Выявить особенности структурно-функциональной организации сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов ишемической болезни сердца.
4. Выявить особенности структурно-функциональной организации сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов инфаркта миокарда.
5. Установить ассоциации miRNA и кандидатных генов для разработки методов диагностики атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.

Научная новизна исследования. Научная новизна настоящей работы заключается в установлении характеристик взаимодействий miRNA и mRNA кандидатных генов развития атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, а также в рекомендации значимых ассоциаций miRNA и кандидатных генов для диагностики данных заболеваний. Комплексный подход включает совместное изучение ассоциаций miRNA и их генов-мишеней с помощью биоинформатических методов.

Установлены характеристики взаимодействия 6272 miRNA в 5'UTR, 3'UTR и в белок-кодирующей области mRNA кандидатных генов, связанных с развитием атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда. Выявлено, что mRNA 171 кандидатных генов атеросклероза взаимодействуют с 453 miRNA; mRNA 144 генов ишемической болезни

сердца взаимодействуют с 405 miRNA; mRNA 173 генов инфаркта миокарда взаимодействуют с 522 miRNA.

Впервые выявлены кластеры сайтов связывания miRNA с mRNA кандидатных генов ССЗ. Кластеры сайтов связывания были образованы с одной mRNA или многими mRNA.

Выявлены полностью комплементарные взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда. Сайты связывания этих miRNA консервативны в mRNA ортологичных генов.

Теоретическая значимость работы. Результаты исследования вносят существенный вклад в представления о молекулярно-генетических механизмах ССЗ, учитывая, что изменение генной экспрессии играет важную патофизиологическую роль в развитии данных заболеваний. Результаты изучения влияния miRNA на кандидатные гены инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца и атеросклероза непосредственно открывают новое направление в диагностике и терапии исследуемых заболеваний.

Практическая ценность исследования. Результаты настоящего исследования взаимодействий miRNA в областях 5'UTR, CDS, 3'UTR mRNA генов-мишеней атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда предлагаются для дальнейших экспериментальных валидаций и создания панелей miRNA и генов-мишеней в качестве диагностики данных заболеваний. Из изученных 6272 miRNA и 683 кандидатных генов предлагаются: ассоциации 37 miRNA и 7 генов атеросклероза, ассоциации 22 miRNA и 15 генов ИБС, ассоциации 52 miRNA и 22 генов ИМ.

Основные положения, выносимые на защиту:

Нуклеотидные последовательности mRNA изученных 171, 144 и 173 генов, участвующих в развитии атеросклероза, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, соответственно, являются мишенями miRNA.

В 5'UTR, CDS, 3'UTR mRNA некоторых кандидатных генов, участвующих в развитии атеросклероза, инфаркт миокарда, ишемической болезни сердца имеются одиночные, множественные сайты и полисайты связывания miRNA.

Кластерная организация сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов изученных заболеваний приводит к компактизации нуклеотидной последовательности mRNA, являющейся мишенью нескольких miRNA и возникновению конкуренции молекул miRNA за связывание с mRNA гена-мишени.

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 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены:

- на XX международной научно-практической конференции "Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования", Москва, Россия, 2019г.;
- на VI Международной научной конференции студентов и молодых учёных «Фараби элемі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан, 2019 г.;
- на Международной научной конференции "Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии", Алматы, Казахстан, 2019 г.;
- на XII Международной научной конференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology», Новосибирск, Россия, 2020 год.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 9 печатных работах, в том числе 1 статья в международном журнале с импакт-фактором, цитируемом в Web of Science; 4 статьи из перечня Комитета по обеспечению качества в сфере образования и науки; 4 тезиса в материалах международных конференций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 175 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка использованных источников из 360 наименований, 2 приложений; содержит 22 таблицы, 3 формулы, 7 рисунков.

Основные результаты исследований и выводы:

1. Создана база нуклеотидных последовательностей 6272 miRNA человека. Отобраны кандидатные гены исследованных ССЗ и на их основе созданы базы нуклеотидных последовательностей 236 генов ассоциированных с атеросклерозом, 209 генов вовлеченных в патогенез ишемической болезни сердца и 238 генов, связанных с развитием инфаркта миокарда.

2. Выявлены кластеры сайтов связывания miRNA в 5'UTR 13 mRNA, в CDS девяти mRNA и в 3'UTR 13 mRNA кандидатных генов атеросклероза. Ортологичные гены *GAS6*, *NFE2L2*, *SCAP* содержат в 5'UTR mRNA консервативные нуклеотидные последовательности кластеров сайтов связывания. Сайты связывания семейства miR-1273 обнаружены в mRNA 10 генов. Особенностью *FASLG*, *FLT1*, *PLA2G7*, *PPARGC1A*, *SOAT1*, *TFPI* кандидатных генов атеросклероза является зависимость их экспрессии от miR-466, ID00436.3p-miR, ID01030.3p-miR имеющих кластеры множественных сайтов связывания. Множественные сайты связывания miR-574-5p, ID00470.5p-miR образуют кластеры сайтов связывания в mRNA генов *IGF1*, *OLR1*, *PPARA*.

3. В 5'UTR mRNA 12 кандидатных генов ишемической болезни сердца имеются кластеры из трех и более сайтов связывания miRNA. Кластеры были выявлены в CDS mRNA семи генов и в 3'UTR mRNA 11 генов. Кластер сайтов связывания miR-619-5p и miR-5095 выявлен в mRNA семи генов, а кластер miR-619-5p и miR-5585-5p выявлен в mRNA двух генов. Сайты связывания семейства miR-1273 обнаружены в mRNA 15 кандидатных генов ишемической болезни сердца. Особенностью генов *NOS1*, *PLA2G7* является зависимость их экспрессии от miR-466, ID00436.3p-miR, ID01030.3p-miR, имеющих

множественные сайты связывания, расположенные в кластеры. Множественные сайты связывания miR-574-5p, ID00470.5p-miR образуют кластеры в mRNA *CDKN2B*, *IGF1*, *NOS1*, *PPARA* - кандидатных генов ишемической болезни сердца

4. Кластеры в 5'UTR mRNA кандидатных генов инфаркта миокарда были выявлены в mRNA 18 генов, в CDS mRNA 13 генов, в 3'UTR mRNA восьми генов. Кластер сайтов связывания miR-619-5p и miR-5095 выявлен в mRNA семи генов, а кластер сайтов связывания miR-619-5p и miR-5585-5p выявлен в mRNA трех генов. Сайты связывания семейства miR-1273 обнаружены в mRNA 11 генов. Особенностью *SP1*, *ICAM1*, *FLT1* генов является зависимость их экспрессии от miR-466, ID00436.3p-miR, ID01030.3p-miR имеющих в их mRNA 18 кластеры множественных сайтов связывания. Множественные сайты связывания miR-574-5p, ID00470.5p-miR образуют кластеры в mRNA *CD40LG*, *CDKN2B*, *IGF1*, *OLR1*, *TRAF3IP2* - кандидатных генов инфаркта миокарда.

5. Структурно-функциональная организации сайтов связывания miRNA в mRNA кандидатных генов атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда разнообразна и включает: взаимодействия одной miRNA с одним геном-мишенью; одной miRNA с несколькими генами мишенями; нескольких miRNA с одним геном с расположением сайтов связывания отдельно и с наложением нуклеотидных последовательностей образующих кластер; одной или нескольких miRNA с множественными сайтами связывания, образующими кластер.

6. Сравнительный анализ трех ССЗ выявил группы генов, чьи белковые продукты вовлечены в различные биологические процессы. Были определены гены, которые при подавлении своей экспрессии, могут быть протекторами от ССЗ или инициаторами данных заболеваний. Протекторами явились *NPC1L1*, *PLA2G7*, *PPAR*, *SOAT1*, *CXCL12*, *GAS6*, *SP1*, *CD40LG*, *F11R*, *DNASE1*, *FLT1*, *KCNJ11*; инициаторами были *ADRB3*, *LDLR*, *SCAP*, *CELSR2*, *CYP1A2*, *LRP8*, *LTA*, *NFE2L2*, *CD36*, *MEFV*, *AP3D1*, *TGFB1*, *MTHFR*, *F2RL3*, *GATA2*, *CDKN2B*, *FASLG*, *TIMP2*, *AS3MT*, *ALMS1*, *NOS1AP*, *NOS1*, *PDE4D*, *ADRB1*, *GAA*, *USP25*, *PPARGC1A*, *MMP2*, *IGF1*, *IRS2*, *SH2B3*, *CHGA*, *ANKS1A*, *SMARCA4*, *DOT1L*.

7. Установлены специфические ассоциации miRNA и кандидатных генов для разработки методов диагностики и терапии атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.