

## ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ *BCL2* И *SIRT1* НА МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ B16 IN VIVO НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОМ MIR-204-5P

Земцов Д.С.

*Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, e-mail: danil\_zemtsov@mail.ru*

Меланома кожи (МК) является крайне агрессивным заболеванием, и если на ранних стадиях заболевание успешно поддается хирургическому лечению, то диссеминированные формы крайне неблагоприятны в прогнозе; на данный момент нет эффективной терапии диссеминированной формы опухоли. Известно, что микроРНК miR-204-5p участвует в регуляции ряда процессов канцерогенеза, в том числе развития меланомы кожи, посредством регуляции генов-мишеней, связанных с опухолевой трансформацией, промоцией и прогрессией онкологических заболеваний. Одними из таких генов-мишеней микроРНК miR-204-5p являются *BCL2* и *SIRT1*, которые принимают участие в регуляции выраженности апоптоза, клеточной пролиферации, миграции и эффектов иммунной системы. В данном исследовании показаны изменения в уровнях экспрессии *BCL2* и *SIRT1* в опухоли меланомы B16, ее органах-мишенях – печени и легких – после ингибирования микроРНК miR-204-5p специфическим ингибитором и выполнения последующего анализа на основе ПЦР в реальном времени. В тканях печени и легких мышей с трансплантированными клетками меланомы B16 отмечалось снижение экспрессии генов-мишеней *SIRT1* и *BCL2*, тогда как в ткани опухоли не было выявлено изменений в уровнях экспрессии этих генов-мишеней. Таким образом, ингибиторы микроРНК на основе антисмысловых олигонуклеотидов в большей степени достигают в паренхиматозных органах, чем первичного первичного опухолевого узла, что может быть обусловлено развитием микроваскулярной сети (эффект васкулогенной мимикрии) или активным выведением молекул олигонуклеотидов из клеток опухоли. При этом наблюдалось неканоническое изменение уровня экспрессии *SIRT1* и *BCL2* при ингибировании miR-204-5p в дистантных органах метастазирования меланомы.

Ключевые слова: miR204-5p, микроРНК, ПЦР, *BCL2*, *SIRT1*, меланома B16, C57Bl6.

## *BCL 2* AND *SIRT1* EXPRESSION IN B16 MELANOMA CELLS IN VIVO UNDER MIR-204-5P INHIBITOR TREATMENT

Zemtsov D.S.

*Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, E-mail address:  
danil\_zemtsov@mail.ru*

Melanoma of the skin is an extremely aggressive disease that is highly curable when it localized but the treatment of disseminated forms remains non effective. MicroRNA are non-coding small RNAs that are involved in various cell processes regulation on posttranscriptional level. MicroRNA miR-204-5p was shown to be implicated in carcinogenesis-related processes by direct targeting of genes associated with neoplastic transformation, tumor promotion and progression. *BCL2* and *SIRT1* as target genes of miR-204-5p are involved in the regulation of apoptosis, cell proliferation control, migration of tumor cells and regulation of the immune system response. In the present study *BCL2* and *SIRT1* expression levels were evaluated in melanoma B16-bearing mice in a tumor in vivo and in its target metastasis organs, liver and lungs. MicroRNA miR-204-5p specific inhibitor was applied followed by accomplishment of the expression analysis to determine aforementioned genes levels alteration provided by PCR real time. *BCL2* and *SIRT1* expression levels were not altered in the tumor whereas down-regulation of *BCL2* and *SIRT1* was detected in lungs and liver. The results of this study show that microRNA inhibitors application based on antisense oligonucleotides allows to target more effectively in parenchymal organs than in the primary tumor node itself, which is probably due to the development of the microvascular network (the effect of vasculogenic mimicry) or active drug efflux by melanoma cells. MicroRNA miR-204-5p inhibitor application in melanoma B16-bearing mice induces non-canonical *BCL2* and *SIRT1* expression levels alterations as down-regulation of these molecules was determined. The down-regulation of target genes under microRNA inhibition may represent a novel approach to manage pathological processes in lungs and liver associated with carcinogenesis.

Keywords: microRNA, miR-204-5p, PCR, *BCL2*, *SIRT1*, melanoma B16, C57Bl6.

Меланома кожи (МК) – одно из наиболее агрессивных злокачественных новообразований кожи, плохо поддающееся лечению и характеризующееся высокой устойчивостью к современной противоопухолевой терапии [1]. В последние годы отмечается формирование новых терапевтических подходов к лечению агрессивных опухолей, включая меланому кожи, особенно ее диссеминированные формы, которые остаются злокачественным новообразованием с крайне неблагоприятным исходом. МК характеризуется выраженными эпигенетическими изменениями, одним из которых является нарушение экспрессии микроРНК [2].

МикроРНК — малые некодирующие молекулы РНК (нкРНК) длиной 18–25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов. Согласно литературным данным, по ранее проведенным исследованиям известно, что повышенная экспрессия микроРНК miR-204-5p повышает миграционную активность клеток, вызывает усиление инвазии и, в конечном итоге, способствует метастазированию опухолевых клеток [3]. Одновременно высокие уровни miR-204-5p в опухолевых клетках МК связывают с онкосупрессорной функцией. И в то же время известно, что нарушенная экспрессия miR-204-5p ассоциирована с развитием резистентности к селективным ингибиторам *BRAF* – одного из ключевых онкогенов, мутации которого наблюдаются при меланоме [4]. Имеющиеся исследования показывают крайне важную роль микроРНК miR-204-5p в регуляции прогрессии опухоли, в том числе при диссеминированной форме меланомы кожи, что позволяет предположить значимость данной микроРНК в качестве возможного диагностического, прогностического маркера или в качестве терапевтической мишени при МК [5]. Учитывая эти данные, целевое воздействие на микроРНК может быть применено для регуляции процессов, связанных с канцерогенезом [6].

Целью данного исследования являлось определение путем постановки ПЦР, уровней экспрессии генов-мишеней микроРНК miR-204-5p *BCL2*, *SIRT1* в паренхиматозных органах и опухолевом узле после введения специфического ингибитора микроРНК miR-204-5p.

#### **Материал и методы исследования**

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, а также в соответствии с Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Предварительно данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета (протокол № 86/2018 от 8 ноября 2018г., Красноярск, Российская Федерация).

*Культирование клеток меланомы и имплантация опухоли*

Замороженные клетки мышинной меланомы В16 размораживали путем помещения их в водяную баню на 1 минуту при температуре 37°C.

Концентрация жизнеспособных клеток определялась на микроскопе МИКМЕД-2 вариант 16 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия) путем окрашивания их метиленовым синим в соотношении 1:1 (20 мкл метиленового синего на 20 мкл клеточный взвеси), подсчет осуществлялся в камере Горяева.

После подсчета клеток и 2-кратной обработки инъекционного поля 70%-ным спиртом лабораторным мышам в боковую поверхность передней брюшной стенки осуществляли подкожную инъекцию клеточной взвеси в объеме 0,5 мл/600 тыс. опухолевых клеток.

#### *Ингибирование miR-204-5p in vivo*

После того как клетки меланомы сформировали значимую опухоль, животные были поделены на 3 группы случайным образом. Каждой группе вводили: контрольной группе (n=10) – 0,01 М фосфатно-буферный раствор (PBS) 100 мкл; группе отрицательного контроля (n=10) – miRCURY LNA™ miRNA Negative Inhibitor Control; опытной группе (n=10) – ингибитор miR-204-5p miRCURY LNA™ microRNA inhibitor в дозировке 25 мг/кг 1 раз в 7 суток согласно инструкции производителя. Для проведения экспериментов использовали синтетический ингибитор miRCURY LNA™ (LNA-i-204-5p) microRNA inhibitor (Qiagen AB, Sollentuna, Sweden) и miRCURY LNA™ miRNA Inhibitor Control (Qiagen AB, Sollentuna, Sweden). В качестве контроля брали стерильный PBS раствор, который вводили в объеме 0,1 мл с тем же режимом введения и в то же место.

#### *Окончание эксперимента и выделение органов*

Эксперимент заканчивали на пятнадцатый день со дня первой трансплантации клеток, умерщвление животных производили под хлороформным наркозом путем декапитации шейных позвонков. Далее производилось выделение органов и тканей животных. Выделенные органы были заморожены при температуре –80°C, оставшаяся часть была стабилизирована в растворе сульфата аммония IntactRNA («Евроген», Москва, Россия) для дальнейшего исследования.

#### *Выделение микроРНК, постановка реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (анализ)*

Выделение тотальной РНК из тканей органов и опухоли производили в ламинарных шкафах ПЦР-бокса. Предварительно фрагменты опухолевой ткани и органов гомогенизировали до однородности с добавлением лизирующего раствора из набора, предназначенного для выделения РНК/ДНК, на основе фенол-хлороформного метода «Рибосорб» («Амплисенс», Россия), по инструкции производителя. Концентрацию тотальной РНК и в пробах определяли на приборе-флуориметре Qubit ® 2.0 (Invitrogen; Thermo Fisher

Scientific, Singapore) с использованием готовых реагентов для определения концентрации РНК Qubit® HS (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Singapore).

Далее для постановки ПЦР в режиме реального времени с целью оценки относительных уровней экспрессии генов-мишеней проводили реакцию обратной транскрипции с использованием реагентов из готовых наборов MMLV RT («Евроген», Москва, РФ) согласно прилагаемой инструкции, для обратной транскрипции использовали коммерческие случайные свободные от нуклеотидов праймеры (№ 4427975, Applied Biosystems, Foster City, USA). В каждую пробирку с раствором тотальной РНК добавляли 1,5 мкл случайного, свободного от нуклеотидов праймера для последующего определения экспрессии мРНК, далее эту смесь нагревали в термостате в течение 2 мин при температуре 70°C, после чего охлаждали на льду в течение 5 мин. Затем к полученной смеси добавляли 5,5 мкл реакционной смеси, которая состояла из 1 мкл dNTP, 1 мкл DTT, 2 мкл 5-кратного стандартного буфера, 0,5 мкл обратной транскриптазы MMLV и 1 мкл чистой от нуклеаз H<sub>2</sub>O. Полученную взвесь помещали в термостат и прогревали при температуре 37°C в течение 50 мин для проведения реакции обратной транскрипции, затем тормозили ее путем прогрева при 70°C в течение 10 мин. Образованные растворы кДНК использовали для амплификации. Объем используемой кДНК на каждый образец составлял 2 мкл. Амплификацию к ДНК осуществляли на термоциклере StepOne (Applied Biosystems, Singapore), термоциклирование проводили по стандартно заданному алгоритму: 50°C – 2 мин, 95°C – 10 мин, затем 40 циклов 95°C – 15 секунд, 60°C – 1 мин, с детекцией в реальном времени флуоресцентного сигнала ROX. Реакционная смесь на каждую реакцию имела объем 18 мкл и состояла из 1 мкл 20х-праймеров TaqMan™ Gene Expression Assay (№ 4331182, Applied Biosystems, США) и TaqMan™ MicroRNA & Non-coding RNA Assay (№ 4427975 и 4440886 Applied Biosystems, USA), 8 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для ОТ-ПЦР в присутствии ROX (Syntol, Москва, Российская Федерация), а также 9 мкл воды, свободной от нуклеаз. Эндогенными нормализующими контролями для исследования уровней экспрессии мРНК бета-актин (Actb Mm00446968\_m1, No. 4331182; Applied Biosystems, USA). Данные анализировали с использованием метода  $\Delta\Delta C_t$ .

#### *Статистический анализ*

Обработку данных проводили с применением программы Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA). После проверки на нормальность применяли непараметрические критерии. Результаты представлены как средние значения и стандартные ошибки среднего ( $M \pm m$ ).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Первоначально после введения специфического ингибитора микроРНК miR-204-5p *in vivo* оценивалась эффективность трансфекции посредством оценки на основе ПЦР в реальном времени уровней экспрессии микроРНК miR-204-5p и ее гомолога miR-211-5p в ткани опухоли, а также в тканях легких и печени, являющихся органами-мишенями метастазирования мышью меланомы B16. Параллельно определялись уровни экспрессии *SIRT1* и *BCL2* – генов-мишеней miR-204-5p.

Согласно проведенному ранее биоинформатическому анализу, *SIRT1* и *BCL2* являются генами-мишенями miR-204-5p. Однако модуляция уровня miR-204-5p и последующего экспрессионного анализа не выявила изменений в экспрессии *BCL2* и *SIRT1* в ткани опухоли меланомы B16 (рис. 1).

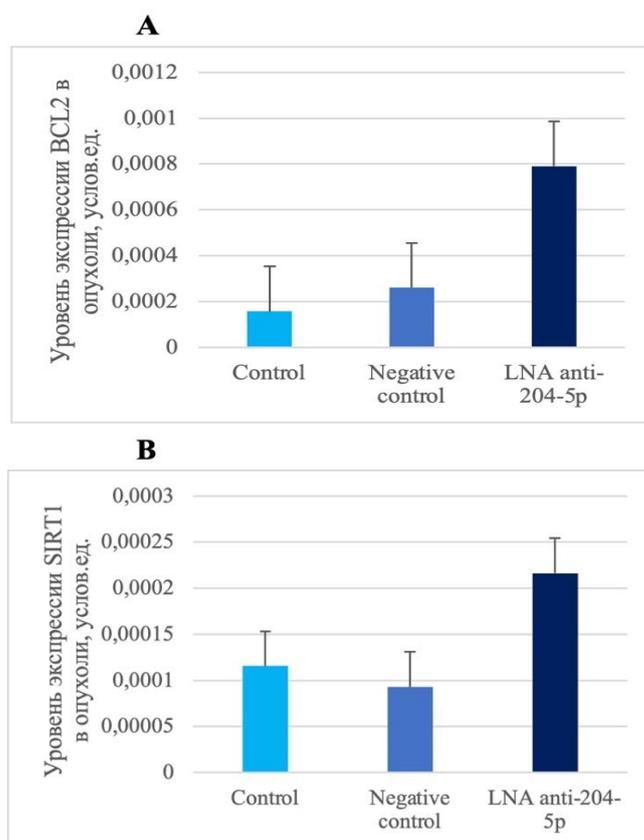


Рис. 1. Уровень экспрессии *BCL2* и *SIRT1* в клетках меланомы B16 *in vivo* после воздействия специфическим ингибитором miR-204-5p. **А** – экспрессия *BCL2* ( $P=0,9230$ ). **В** – экспрессия *SIRT1* ( $p=0,8954$ )

В ткани легкого мышей, которым вводился специфический ингибитор микроРНК miR-204-5p, выявлено снижение уровней экспрессии *SIRT1* по сравнению с показателями их экспрессии у животных группы негативного контроля и контроля (рис. 2).

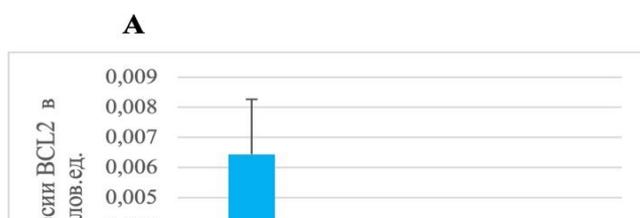
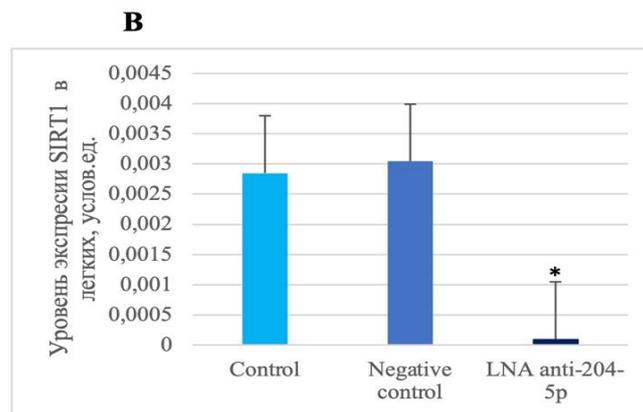
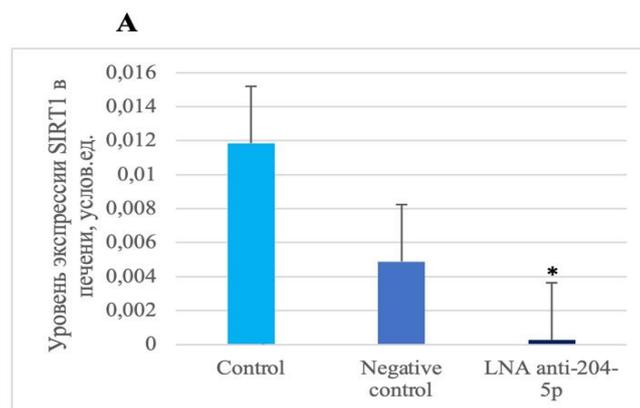


Рис. 2. **А** – уровень легких после специфическим 204-5p. **В** – уровень ткани легкого воздействия ингибитором miR-



экспрессии BCL2 в воздействия ингибитором miR- экспрессии SIRT1 мышей после специфическим 204-5p. \*  $p=0,0160$

Определение уровней экспрессии *SIRT1* и *BCL2* в печени показало снижение уровня *SIRT1* и *BCL2* у мышей, которым проводилось введение специфического ингибитора miR-204-5p, по сравнению с показателями у группы мышей, которым осуществлялось введение негативного контроля (рис. 3).



## В

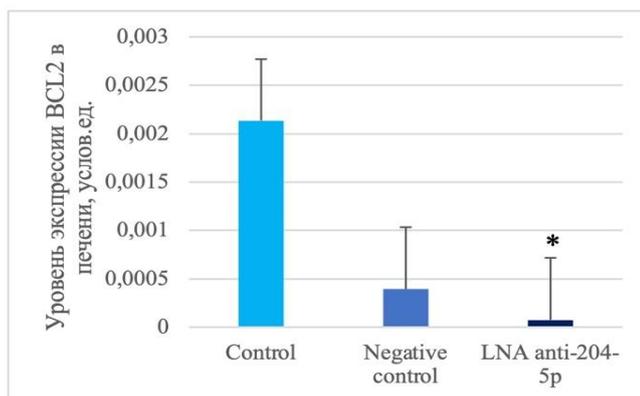


Рис. 3. Уровни *SIRT1* и  
печени после

*BCL2* в ткани  
воздействия

специфическим ингибитором *miR-204-5p*. *A* – уровень экспрессии *SIRT1* \* ( $p=0,03$ ). *B* –  
уровень экспрессии *BCL2* \* ( $p=0,0158$ )

## Выводы

Экспериментальное исследование, выполненное с участием мышей линии C57Bl6 с трансплантированной меланомой, которым вводился ингибитор *miR-204-5p*, показало, что максимальные эффекты при воздействии антисмысловыми олигонуклеотидами определяются в паренхиматозных органах. Согласно биоинформатическому и экспрессионному анализу, микроРНК *miR-204-5p* является регулятором *BCL2* и *SIRT1*. В паренхиматозных органах, являющихся органами-мишенями метастазирования меланомы B16 (печени и легких), определялось изменение экспрессии *BCL2* и *SIRT1*. Это свидетельствует, что они являются функциональными мишенями *miR-204-5p* в данных органах и могут быть связаны с контролем пролиферации, выживаемости, миграции опухолевых клеток и реакций иммунной системы. Стоит отметить, что снижение уровней экспрессии микроРНК *miR-204-5p* ведет к снижению экспрессии генов *BCL2* и *SIRT1* в ткани легкого, но отсутствию изменений в ткани опухоли меланомы B16, что может быть обусловлено многочисленными процессами, лежащими в основе формирования лекарственной устойчивости злокачественных новообразований, – васкулогенной мимикрией, активным выведением лекарственных веществ из опухолевых клеток, модификацией мишеневых молекул.

Дальнейшие исследования терапевтической ценности антисмысловых олигонуклеотидов, в равной степени как и таргетирования микроРНК, могут быть обусловлены возможностью применения этих подходов в экспериментальной терапии меланомы и онкологии в целом.

## Список литературы

1. Рукша Т.Г., Прохоренков В.И., Салмина А.Б., Петрова Л.Л., Труфанова Л.В. Современные представления об этиологии и патогенезе меланомы кожи // Вестник дерматологии и венерологии. 2007. № 5. С. 22-28.

2. Aksenenko M.B., Palkina N.V., Sergeeva O.N., Sergeeva E.Yu., Kirichenko A.K., Ruksha T.G. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, NFE2L2, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage. // *Int. J. Exp. Pathol.* 2019. Vol. 100, № 5–6. P. 311-319. DOI: 10.1111/iep.12342.9.
3. Hong B.S., Ryu H., Kim N., Kim J., Lee E., Moon H., Kim KH., Jin MS., Kwon NH., Kim S., Kim D., Chung DH., Jeong K., Kim K., Kim KY., Lee HB., Han W., Yun J., Kim JI., Noh DY., Moon HG. Tumor Suppressor miRNA-204-5p Regulates Growth, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer // *Cancer Res.* 2019. Vol. 79, № 7. P. 1520-1534. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0891.
4. Vitiello M., Tuccoli A., D'Aurizio R., Sarti S., Giannecchini L., Lubrano S., Lubrano S., Marranci A., Evangelista M., Peppicelli S., Ippolito C., Barravecchia I., Guzzolino E., Montagnani V., Gowen M., Mercoledi E., Mercatanti A., Comelli L., Gurrieri S., Wu LW., Ope O., Flaherty K., Boland GM., Hammond MR., Kwong L., Chiariello M., Stecca B., Zhang G., Salvetti A., Angeloni D., Pitto L., Calorini L., Chiorino G., Pellegrini M., Herlyn M., Osman I., Poliseno L. Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 15. P. 25395-25417. DOI: 10.18632/oncotarget.15915.
5. Aksenenko M B., Kirichenko A.K., Ruksha T.G. Russian study of morphological prognostic factors characterization in BRAF-mutant cutaneous melanoma // *Pathology - Research and Practice.* 2015. № 7. P. 521-527.
6. Peng Y., Chen FF., Ge J., Zhu JY., Shi XE., Li X., Yu TY., Chu GY., Yang GS. miR-429 Inhibits Differentiation and Promotes Proliferation in Porcine Preadipocytes // *Int. J. Mol Sci.* 2016. Vol. 17. № 12. P. 2047. DOI: 10.3390/ijms17122047.