

Для цитирования: Дубовцева И.Ю., Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Роль сиртуина 1 в регуляции клеток меланомы. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(6): 82–89. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-82-89.
For citation: Dubovtseva I. Yu., Akseenenko M. B., Ruksha T. G. Role of sirtuin 1 in regulation of melanoma cell proliferation. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(6): 82–89. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-82-89.

РОЛЬ СИРТУИНА 1 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

И.Ю. Дубовцева, М.Б. Аксененко, Т.Г. Рукша

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия
Россия, г. Красноярск, 660022, ул. Партизана Железняка, 1. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Аннотация

Меланома кожи остается одним из самых опасных злокачественных новообразований среди населения со светлым типом кожи. Поиск новых эффективных способов лечения, включая терапию, основанную на выборе молекулярных мишеней, – одна из основных и сложных задач в изучении меланомы. Среди направлений экспериментальной онкологии выделяется исследование роли микроРНК, которые участвуют во многих физиологических и патологических процессах на эпигенетическом уровне. Ранее было выявлено, что уровень miR-204-5p снижается в злокачественных новообразованиях, в частности при меланоме кожи. Основной целью данной работы было определение функциональной роли гена-мишени miR-204-5p SIRT1 в патогенезе меланомы кожи. По итогам бионформатического анализа были идентифицированы гены-мишени данной микроРНК, влияющие на апоптоз, пролиферацию и жизнеспособность клеток. Оценка уровня пролиферации клеток меланомы под воздействием малых интерферирующих РНК осуществлялась при помощи МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии. Определение относительной активности люциферазы проводилось с использованием нуклеотидной последовательности ДНК 3'-некодирующей области гена SIRT1 и синтетического аналога miR-204-5p in vitro. Результаты двойного люциферазного теста показали, что miR-204-5p подавляет экспрессию SIRT1 посредством связывания с его 3'-некодирующей областью. Пролиферативная активность клеток меланомы снижалась через 48 ч в клетках меланомы после осуществления селективного нокадауна SIRT1. Результаты флуоресцентной микроскопии показали однонаправленную тенденцию с результатами МТТ-теста. МикроРНК miR-204-5p может регулировать пролиферацию клеток меланомы посредством воздействия на SIRT 1, который, в свою очередь, воздействует на активность процессов внутриклеточной сигнализации, имеющих отношение к динамике клеточного цикла.

Ключевые слова: меланома, siRNA, miR-204-5p, микроРНК, сиртуин 1, гены-мишени, апоптоз.

ROLE OF SIRTUIN 1 IN REGULATION OF MELANOMA CELL PROLIFERATION

I.Yu. Dubovtseva, M.B. Akseenenko, T.G. Ruksha

Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Russian Federation Ministry of Health Care, Krasnoyarsk, Russia
1, P. Zheleznyaka Street, 660022, Krasnoyarsk, Russia. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Abstract

Melanoma remains one of the most dangerous skin cancers among fair-skinned population. The search for new effective treatments, including therapy based on the selection of molecular targets, is one of the main and difficult tasks in the study of melanoma. One of the trends in experimental oncology is the study of microRNA's role in carcinogenesis. MicroRNAs are involved in many physiological and pathological processes, including cell proliferation, differentiation, migration, invasion, and carcinogenesis. It has been previously revealed that miR-204-5p levels are reduced in malignant tumors, in particular, in skin melanoma. The aim of this study was to determine the functional role of SIRT1 as a direct target of miR-204-5p in the pathogenesis of skin melanoma. Bioinformatics analysis allowed identification of microRNA target genes that affected apoptosis, proliferation

and cell viability. The level of proliferation of melanoma cells under the influence of small interfering RNA was estimated using the MTT test and fluorescence microscopy. Luciferase Reporter assay was performed to evaluate whether SIRT1 was a target of miR-204-5p. Relative luciferase activity was calculated 48 hours after transfection with miR-204-5p mimic. The MTT test showed that the proliferative activity of melanoma cells decreased 72 hours after siRNA SIRT1 knockdown. Fluorescent microscope revealed the same tendency in SIRT1 siRNA transfected cells. Mechanistic studies revealed that miR-204-5p repressed the expression of SIRT1 through binding to its 3' UTR. Therefore, miR-204-5p can regulate melanoma cell proliferation by targeting SIRT1 which can affect intercellular signaling systems related to cell cycle.

Key words: melanoma, siRNA, miR-204-5p, miRNA, sirtuin 1, target genes, apoptosis.

Введение

Меланома кожи (МК) – злокачественная опухоль нейроэктодермального происхождения, которая является самым опасным злокачественным новообразованием кожи, встречающимся среди населения со светлым типом кожи [1, 2]. Воздействие ультрафиолетового излучения, в том числе и кратковременное, и присутствие специфических фенотипических характеристик – светлый цвет кожи, светлые или рыжие волосы, веснушки, более 10 диспластических невусов, а также более 100 обычных приобретенных меланоцитарных невусов – являются установленными факторами риска для развития меланомы кожи [3–6]. Во всем мире на протяжении последних лет наблюдается рост уровня заболеваемости меланомой среди лиц со светлым типом кожи [7]. Лечение меланомы на ранних стадиях в большинстве случаев проходит успешно, однако при диссеминированной МК результаты терапии неудовлетворительные [8]. Поиск новых терапевтических направлений, в том числе на основе выбора молекулярных мишеней при лечении МК, является одной из ключевых задач современной онкологии.

Одной из тенденций экспериментальной онкологии является изучение некодирующих РНК. МикроРНК – эндогенные одноцепочечные молекулы РНК длиной около 22 нуклеотидов. МикроРНК играют важную роль в регуляции многих физиологических и патологических процессов [9]. Анализ экспрессии микроРНК при различных злокачественных новообразованиях человека предполагает использовать их в качестве потенциальных биомаркеров опухоли [10]. Традиционно считается, что микроРНК негативно регулируют экспрессию генов посредством связывания с 3' нетранслируемым регионом целевой мРНК, приводя к деградации или репрессии трансляции данной мРНК [11]. МикроРНК miR-204-5p относится к одной из минимально экспрессируемых микроРНК в клетках меланомы по сравнению с меланоцитарными невусами [12]. Показано, что восстановление уровня miR-204-5p в опухолевых клетках приводит к изменению выраженности их пролиферации, миграции и инвазии [13]. Помимо этого, определено, что эктопическая экспрессия miR-204-5p в клетках меланомы вызывает потерю резистентности к вемурафенибу, а также изменяет

уровни компонентов сигнального каскада MAPK, принимающего ключевое участие в регуляции пролиферации клеток меланомы [14].

Целью исследования являлось определение функциональной роли гена-мишени miR-204-5p сиртуина 1 (SIRT1) в патогенезе меланомы.

Материал и методы

Эксперименты проводились на клеточных линиях меланомы человека BRO. Клеточная линия меланомы BRO была предоставлена ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином (Gibco, Life Technologies, Пейсли, Великобритания) с 10 % фетальной бычьей сывороткой (FBS; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Нью-Йорк, США) при 37 °C и 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе Sanyo MSO-5AC (Sanyo MSO-5AC; Sanyo Electric Co., Ltd., Осака, Япония).

Поиск и анализ генов-мишеней для miR-204-5p осуществлен с помощью четырех независимых баз данных: TargetScan (версия 7.0; <http://www.targetscan.org>), miRDB (версия 5.0; <http://mirdb.org/mirdb>), miRTarBase (версия 4.5; <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>). На следующем этапе выбирались гены-мишени miR-204-5p, которые были общими для всех вышеперечисленных баз данных. Далее были выделены гены-мишени, TargetScore которых в базе miRDB был 80 и выше. После этого выбраны гены-мишени, функциональная роль которых была ассоциирована с регуляцией процесса клеточной пролиферации. Для характеристики молекулярных и биологических различий был проведен анализ генных онтологий (биологических процессов и молекулярных функций) при помощи системы PANTHER v10.0. (www.pantherdb.org). В анализ включены онтологии со статистической значимостью $p < 0,05$.

На первом этапе осуществлялись дизайн и подбор последовательности малых интерферирующих РНК, а также выбор скрамблированных последовательностей при помощи программы siDirect 2 (<http://sidirect2.rnai.jp>) [15]. После анализа программой выдавалось несколько последовательностей малых интерферирующих РНК, из которых выбиралась одна, соответствующая следующим

требованиям: длина последовательности – 20–25 нуклеотидов, содержание G/C нуклеотидов 35–55 %, на 3' каждой из цепей добавлялся неспаренный дезоксирибонуклеотид dTdT (для увеличения стабильности дуплекса и эффективности загрузки siРНК в комплексе с RISC), при анализе последовательности siРНК с помощью системы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) не обнаруживались транскрипты других генов, полностью комплементарные последовательности выбранных siРНК, отобранные последовательности не должны были содержать нуклеотидных повторов, а также более 3 одинаковых нуклеотидов подряд.

Для оценки специфичности нокдауна и вызываемых ими побочных изменений в клетке применялся отрицательный контроль. При этом использовались скрамблированные siРНК, которые имели тот же нуклеотидный состав, что и целевые siРНК, но другую нуклеотидную последовательность. Малые интерферирующие РНК были подобраны при помощи программы Wizard Software v.3.1. (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Юджин, США). Синтез siРНК и их скрамблированных последовательностей осуществлялся компанией ООО «Синтол» (г. Москва, Россия).

Трансфекция siРНК в клетки меланомы линии BRO осуществлялась при достижении клетками 70 % конfluence с помощью Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Карлсбад, США).

Оценка пролиферации/жизнеспособности клеток меланомы осуществлялась на основе МТТ-теста. Для этого клетки меланомы культивировали в 24-луночном планшете без каких-либо вмешательств 24 ч. По достижении клеточной концентрации 3×10^6 в 500 мкл питательной среды RPMI-1640 с L-глутамином (Gibco, Life Technologies, Пейсли, Великобритания) и 10 % фетальной бычьей сывороткой (FBS; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Нью-Йорк, США) была заменена питательная среда и клетки трансфицировались малыми интерферирующими РНК к SIRT 1. Трансфекция проводилась при помощи Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Карлсбад, США) с малыми интерферирующими смысловыми, анти-смысловыми, скрамблированными РНК к SIRT 1 согласно инструкции производителя. По истечении 24 ч трансфекции из лунок удалялась питательная среда, клетки промывались фосфатно-буферным раствором (Phosphate Buffered Saline, VWR International, LL AMRESCO, Солон, США), трипсинизировались с использованием Trypsin-EDTA (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Пейсли, Великобритания) и рассеивались в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^4 клеток в 1 мл по 100 мкл в лунку. После клетки инкубировались еще в течение 24 ч при 37 °C в 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo MSO-5AC; Sanyo Electric Co., Ltd., Осака, Япония).

В дальнейшем питательная среда удалялась, в каждую лунку добавлялся раствор 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Юджин, США) в концентрации 5 мг/мл, в соотношении 15 мкл раствора МТТ и 135 мкл питательной среды. Клетки с раствором МТТ инкубировались 4 ч при 37 °C с 5 % содержанием CO₂ в CO₂-инкубаторе. По интенсивности накопления формазана, который имеет фиолетовую окраску, оценивалась метаболическая активность клеток в лунках через 24, 48 и 72 ч после трансфекции. Измерения проводили на спектрофотометре Efos-9305 (Shvabe Photosystems, г. Москва, Россия) на длине волны 560 нм. Отрицательным контролем являлась культура клеток меланомы без воздействия малых интерферирующих РНК. Негативным контролем являлись клетки, трансфицированные со скрамблированными малыми интерферирующими РНК. Эксперимент проводили в трех технологических повторах.

Для проведения флуоресцентной микроскопии 150 мкл трансфицированных клеток меланомы в концентрации 5×10^4 клеток/мл рассеивали в 96-луночный планшет и инкубировали 24 ч при 37 °C в 5 % CO₂. По прошествии 24, 48 и 72 ч клетки окрашивали с использованием CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay (Thermo Fisher Scientific, Орегон, США) в соответствии с протоколом производителя. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре проводили флуоресцентную микроскопию ($\times 460$) с использованием системы флуоресцентной визуализации клеток Fluid® Cell Imaging Station (Fluid Software, версия № 22809; Thermo Fisher Scientific, Inc., Юджин, США). Подсчёт производится в 10 полях зрения. Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зелёный цвет, тогда как непролиферирующие ядра живых клеток оставались неокрашенными. Эксперимент проводили в трех технологических повторах.

Функциональная валидация SIRT1 как гена-мишени miR-204-5p в клетках меланомы выполнялась на основе двойного люциферазного теста. С этой целью произведены синтез нуклеотидной последовательности ДНК 3'-некодирующей области гена SIRT1 человека, клонирование синтезированного фрагмента ДНК, вставка в плазмидный вектор системы The Ambion® pMIR-REPORT Luciferase miRNA Expression Reporter Vector System (Invitrogen™, Applied Biosystems, Фостер, США) по сайтам рестрикции, которые были рекомендованы производителем плазмидного вектора. Состав вышеуказанного вектора включал репортерную плазмиду со вставкой гена ренилловой люциферазы и нормировочную плазмиду β-галактозидазы в соотношении 10:1. Далее осуществлялась работа готовой конструкции плазмидного вектора со встроенными фрагментами ДНК до количества 20 мкг. Осуществлена трансфекция конструкции в клетки меланомы линии BRO при помощи

Таблица

Гены-мишени miR-204-5p, участвующие в регуляции клеточной пролиферации

Название гена-мишени	Target score*	Биологические процессы
FOXC1 (forkhead box C1)	91	Пролиферация, миграция клеток, негативная регуляция митотического цикла
SIRT1(sirtuin 1)	90	Пролиферация клеток, связывание с белками, ионами металлов, кератиновыми нитями, участие в клеточном иммунном ответе, поддержание гомеостаза триглицеридов и холестерина, организация хроматина, ангиогенез, эксцизионная репарация ДНК в ответ на УФ-индуцированное повреждение клетки, позитивная регуляция p53 зависимого апоптоза
TGFBR1 (TGF beta receptor 1)	82	Позитивная регуляция клеточной пролиферации и миграции, апоптоз, ангиогенез, индуцирование серин-треонин протеинкиназной активности
USP47 (ubiquitin specific peptidase 47)	80	Пролиферация, клеточная дифференцировка

Примечание: * – по результатам базы данных miRDB, версия 5.0.

Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Карлсбад, США). Отрицательными контролями служили: исходная культура клеток меланомы линии BRO (интактные клетки без трансфекции); плазмидная ДНК без вставки нуклеотидной последовательности ДНК 3'-некодирующей области гена SIRT1; клетки, трансфецированные мимиком (синтетическим аналогом) miR-204-5p mirVana®miRNA (Ambion, ThermoFisher Scientific, USA) (без плазмиды) с конечным содержанием имитатора (мимика микроРНК) 30 нМ. В качестве положительного контроля использовали клетки, трансфецированные вектором: плаزمида pcDNA 3.1 (+), модифицированная pcDNA3m3-c_{gre}GFP2+ (GFP из *Clytia gregaria*, мутированный для созревания при 37 °C) в концентрации, эквивалентной концентрации репортерного гена (GFP вектор был любезно предоставлен лабораторией фотобиологии ФГБНУ «Института биофизики» Сибирского отделения Российской академии наук обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск). Контроль эффективности трансфекции производился путём определения процента трансфецированных клеток с помощью метода флуоресцентной микроскопии на приборе Invitrogen™ EVOS™ FLoid™ Cell Imaging Station (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Юджин, США).

Через 24 ч после трансфекции опухолевых клеток выполнялась оценка люциферазной активности с помощью набора Dual-Light® Systems (Applied Biosystems, Фостер, США). Для этого в клеточные лизаты последовательно добавлялись: буфер А (Dual-Light® Systems Applied Biosystems, Фостер, США); субстрат Galacton-Plus® в соотношении 1:100 с буфером В (Dual-Light® Systems Applied Biosystems, Фостер, США), содержащий люциферин из расчёта 100 мкл на лунку. Измерение люциферазной и β-галактозидазной активности проводилось при помощи планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold

Technologies, GmbH&Co, Berthold, Германия). Коэффициент люминесценции рассчитывался как отношение люминесценции люциферазы к люминесценции β-галактозидазы для каждой лунки по отдельности.

Статистическая значимость рассчитывалась критерием Стьюдента для зависимых выборок и U-тестом Манна – Уитни в программном пакете для статистического анализа «Statistica 12.0» компании StatSoft. Результаты считались значимыми при p<0,05. Данные представляли в виде среднего и его стандартной ошибки.

Результаты

На основе биоинформатического анализа для miR-204-5p выявлено 235 генов-мишеней, участвующих в 32 биологических процессах. Общими в четырех примененных базах данных являлись 36 генов, имеющих target score в базе miRDB от 80 и выше. Проведен анализ генных онтологий молекулярных и биологических паттернов при помощи системы PANTHER версия 10.0. При помощи вышеуказанной базы данных установлена функциональная роль генов-мишеней, которые были определены по результатам нескольких биоинформационных систем анализа. Среди них были выявлены гены-мишени, биологические паттерны которых связаны с процессом клеточной пролиферации (таблица).

Описаны 34 сигнальных механизма, в реализации которых принимают участие вышеуказанные гены-мишени miR-204-5p. Среди них можно выделить сигнальный путь апоптоза, кадгеринов, эндотелина, p53, сигнальный путь Wnt, сигнальный путь хемокинов и цитокинов при воспалении.

На следующем этапе были проанализированы потенциальные сайты связывания miR-204-5p с выявленными генами-мишенями при помощи баз данных: TargetScanHuman Release 7.1 (<http://www.targetscan.org>), база данных miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) и microRNA.org ([СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. 2019; 18\(6\): 82–89](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

micogna.org). Выявлено, что для генов SIRT1 сайт связывания miR-204-5p с мРНК имеет высокую степень комплементарности нуклеотидов в не-транслируемой области.

Для валидации SIRT1 как гена-мишени miR-204-5p была выполнена оценка относительной люциферазной активности репортерной конструкции. Проведение флуоресцентной микроскопии с GFP-плазмидой показало наличие более 50 % клеток, имеющих характерное зеленое свечение, что позволяет говорить об эффективности проведенной трансфекции и об отсутствии ложноотрицательной реакции (рис. 1).

Относительная люциферазная активность в отрицательном контроле (плазмида без вставки) составила $1,27 \pm 1,45$. В интактных клетках (без проведения трансфекции) люциферазное свечение не выявлялось, что указывало на отсутствие ложноположительной люциферазной реакции в образцах. Относительная люциферазная активность в лизатах опухолевых клеток меланомы линии BRO с трансфекцией репортерной конструкции составила $10,50 \pm 2,04$. В клетках, которые инкубировались с мимиком (имитатором) miR-204-5p, люциферазная активность значительно снизилась и составила $0,25 \pm 0,11$ ($p=0,001$). Таким образом, двойной люциферазный репортерный анализ показал, что микроРНК miR-204-5p ингибирует люциферазную активность репортерных систем,

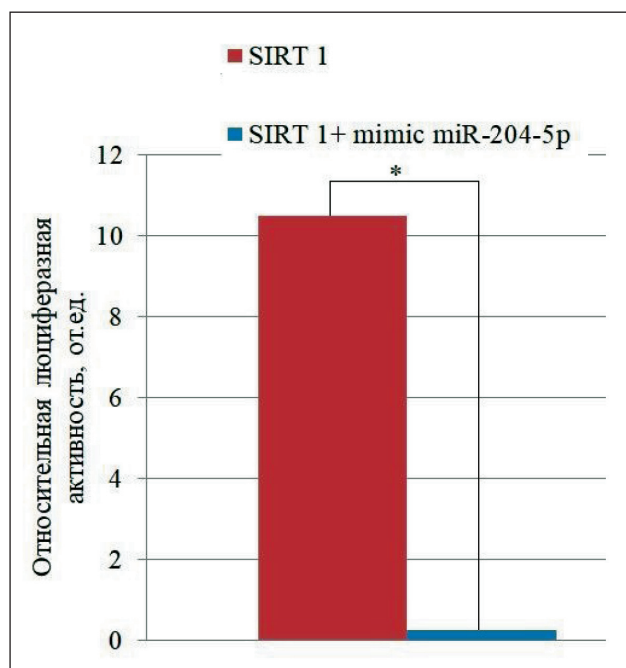


Рис. 2. Относительная активность ренилловой люциферазы через 48 ч после трансфекции мимика miR-204-5p в клетках меланомы линии BRO. Нормализацию активности ренилловой люциферазы осуществляли по β-галактозидазной активности. Примечание: * – статистически значимые различия при воздействии на клетки плазмиды SIRT1 без и после добавления имитатора miR-204-5p ($p=0,021$)

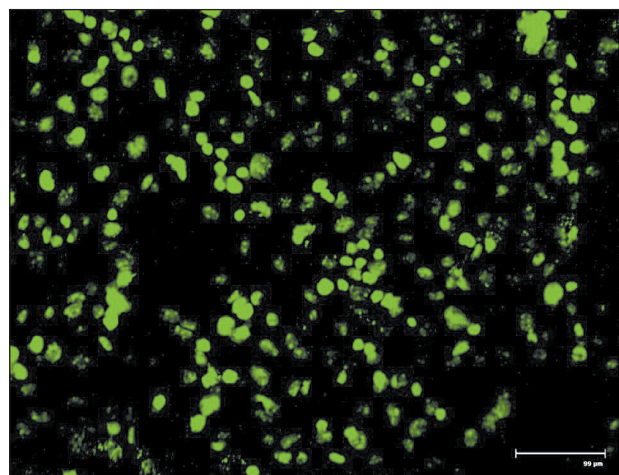


Рис. 1. Микрофото. GFP-трансфицированные клетки меланомы линии BRO, детекция методом флуоресцентной микроскопии. Наличие характерного зеленого свечения клеток меланомы при флуоресцентной микроскопии подтверждает эффективность трансфекции репортерной плазмиды. Флуоресцентная микроскопия, $\times 460$

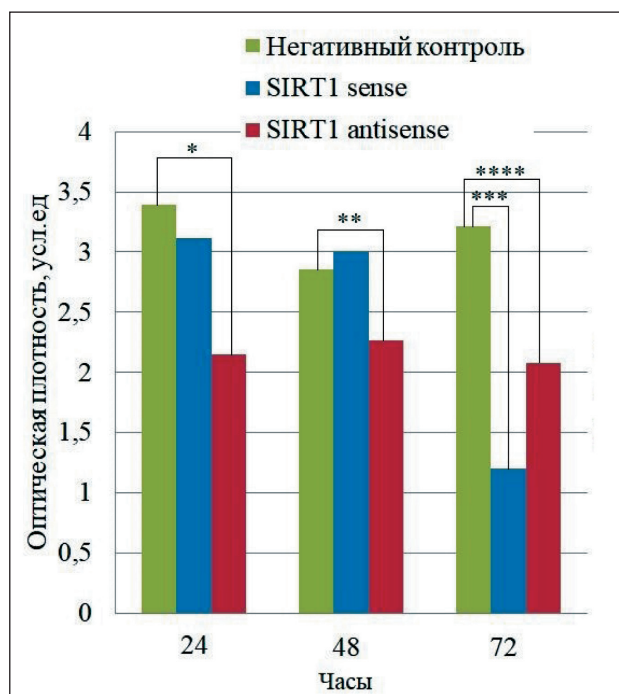


Рис. 3. Результаты MTT-теста в клетках меланомы линии BRO после «сайленсинга» гена SIRT1 малыми интерферирующими РНК.

Примечание: * – статистически значимые различия пролиферативной активности клеток меланомы линии BRO, трансфицированных малыми интерферирующими РНК к SIRT1, и клетками контроля через 24 ч после трансфекции ($p=0,0300$); ** – статистически значимые различия пролиферативной активности клеток меланомы линии BRO, трансфицированных малыми интерферирующими РНК к SIRT1, и клетками контроля через 48 ч после трансфекции ($p=0,037$); ****/***** – статистически значимые различия пролиферативной активности клеток меланомы линии BRO, трансфицированных малыми интерферирующими РНК к SIRT1 и клетками контроля через 72 ч после трансфекции ($p=0,033/0,031$)

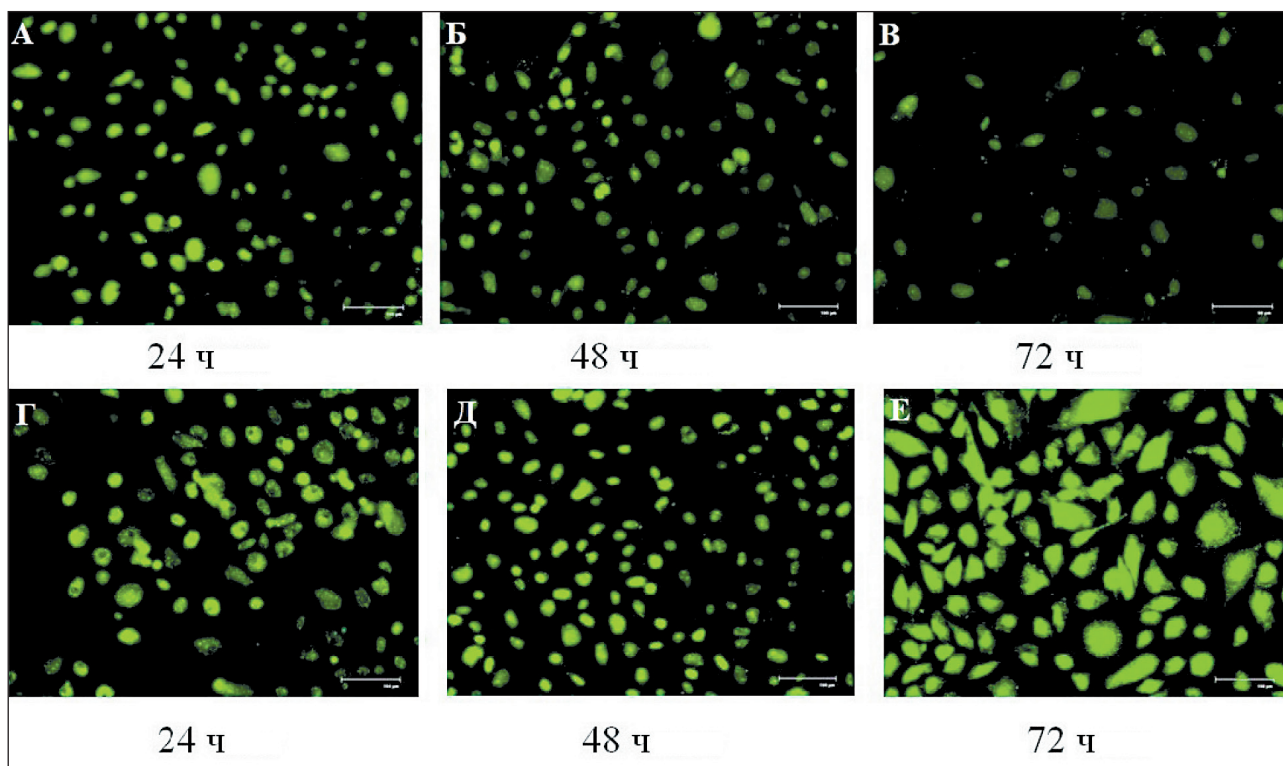


Рис. 4. Микрофото. Оценка клеточной пролиферации клеток меланомы линии BRO методом флуоресцентной микроскопии с использованием системы детекции CyQUANT после трансфекции малых интерферирующих РНК к SIRT1 и трансфекции скрамблированных последовательностей РНК: а) через 24 ч после трансфекции малых интерферирующих РНК к SIRT1; б) через 48 ч после трансфекции малых интерферирующих РНК к SIRT1; в) через 72 ч после трансфекции малых интерферирующих РНК к SIRT1; г) через 24 ч после трансфекции скрамблированных последовательностей РНК; д) через 48 ч после трансфекции скрамблированных последовательностей РНК; е) через 72 ч после трансфекции скрамблированных последовательностей РНК. Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зелёный цвет, тогда как ядра непролиферирующих живых клеток оставались неокрашенными. Флуоресцентная микроскопия, $\times 460$

содержащих нетранслируемую область гена SIRT1 на 14,29 % (рис. 2).

При трансфекции малых интерферирующих РНК гена SIRT1 в клетки меланомы с последующим осуществлением МТТ-теста выявлено, что пролиферативная активность клеток меланомы снижалась через 72 ч в клетках, где был осуществлен селективный нокадаун SIRT1, но не в контрольной серии экспериментов (рис. 3).

В результате визуализации клеток методом флуоресцентной микроскопии с использованием CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay установлено, что под воздействием смысловой интерферирующей РНК к SIRT1 клеточная пролиферация уменьшилась на третьи сутки в полтора раза ($p=0,048$). Уменьшилась жизнеспособность клеток под воздействием антисмысловой интерферирующей РНК к SIRT1 в два раза ($p=0,036$). У клеток под воздействием скрамблированными интерферирующими РНК к SIRT1 пролиферация увеличилась в 2,5 раза ($p=0,017$) (рис. 4).

Обсуждение

По результатам биоинформатического анализа miR-204-5p является регулятором нескольких сигнальных путей, участвующих в канцерогенезе,

таких как меланогенез, сигнальный путь эстрогенов, нарушение транскрипции при раке, регуляции плюрипотентных стволовых клеток. Биоинформатический анализ показал, что SIRT1 является геном-мишенью для miR-204-5p. По данным других авторов, белки SIRT1 дифференциально экспрессируются в меланоме [16]. SIRT1 представляет собой гистондеацетилазу класса III (HDAC), которая может деактивировать гистоны или многие негистоновые белки, включая p53, NF- κ B, AP-1 и PGC-1 α [17, 18]. SIRT1 играет важную роль в регуляции апоптоза, транскрипции, участвует в устранении поврежденной ДНК и может служить потенциальной мишенью для терапии злокачественных новообразований [19]. Есть данные, что SIRT1 способствует сохранению жизнеспособности опухолевых клеток при раке поджелудочной железы [20], легких [21], лимфоме [22] путем ингибирования SIRT1-опосредованных сигнальных путей. Вместе с тем роль SIRT1 в регуляции пролиферации клеток меланомы остается малоизученной. В этой связи было определено изменение пролиферации клеток меланомы после трансфекции малыми интерферирующими РНК к SIRT1.

С учетом данных, полученных при помощи биоинформатического анализа, была создана генная

конструкция для определения SIRT1 как функциональной мишени miR-204-5p. При сравнительном анализе клеток, содержащих синтетический аналог микроРНК, и контроля были получены результаты, свидетельствующие об изменении относительного уровня люциферазной активности. Полученные результаты подтверждают, что SIRT1 является функциональной мишенью для miR-204-5p. С учетом этого стоит отметить наличие литературных данных, указывающих, что снижение уровня SIRT1 в опухолевых клетках ведет к изменению экспрессии и функционирования регулятора клеточного цикла ингибитора циклин-зависимой киназы 1A p21 [23]. В другом исследовании показано, что SIRT1 может индуцировать активацию сигнального каскада MAPK [24], являющегося одним из ключевых регуляторов пролиферации клеток меланомы. SIRT1 относится к классу полифункциональных белков, который посредством ферментативной активности регулирует многочисленные процессы в клетках,

включая резистентность к апоптозу, адгезию и межклеточную коммуникацию, продукцию цитокинов при воспалении. Исходя из этого, можно предположить, что SIRT1 может принимать участие в изменении пролиферации клеток меланомы, функционируя как мишень miR-204-5p и опосредуя ее эффекты.

Заключение

На основании выполненного исследования выявлено, что воздействие на 3'UTR- гена SIRT1 приводит к изменению уровня продукции генов репортерной конструкции и изменению люциферазной активности в клетках меланомы линии BRO при воздействии имитатором miR-204-5p. Проведение нокдауна гена SIRT1 малыми интерферирующими РНК в клетках меланомы линии BRO приводит к изменению пролиферативной активности в клетках данного типа.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Молочков В.А., Демидова Л.В. Меланоцитарные невусы и меланома кожи. М., 2012. 112 с. [Molochkov V.A., Demidova L.V. Melanocytic nevi and skin melanoma. Moscow, 2012. 112 p. (in Russian)].
2. Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х. Онкология. М., 2010. 920 с. [Davydov M.I., Gantsev Sh.Kh. Oncology. Moscow, 2010. 920 p. (in Russian)].
3. Gandini S., Sera F., Cattaruzza M.S., Pasquini P., Picconi O., Boyle P., Melchi C.F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. Eur J Cancer 2005; 41: 45–60. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.016
4. Gandini S., Sera F., Cattaruzza M.S., Pasquini P., Picconi O., Melchi F.C., Boyle P. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. Eur J Cancer 2005; 40: 41–59. doi: 10.1016/j.ejca.2005.03.034.
5. Berwick M., Buller D.B., Cust A., Gallagher R., Lee T.K., Meyskens F., Pandey S., Thomas N.E., Veierød M.B., Ward S. Melanoma epidemiology and prevention. Cancer Treat Res. 2016; 167: 17–49. doi: 10.1007/978-3-319-22539-5_2.
6. Mihajlovic M., Vlajkovic S., Jovanovic P., Stefanovic V. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. Int J Clin Exp Pathol 2012; 5(8): 739–753. doi: 10.1186/s13104-015-1459-3.
7. Fortes C., Vries E. Nonsolar occupational risk factors for cutaneous melanoma. Int J Dermatol. 2008 Apr; 47(4): 319–28. doi: 10.1111/j.1365-4632.2008.03653.x.
8. Wang Z. MicroRNA: A matter of life or death. World J Biol Chem. 2010; 1: 41–54. doi: 10.4331/wjbc.v1.i4.41.
9. Chen Z., Li Z., Soutto M., Wang W., Piazuolo M.B., Zhu S., Guo Y., Maturana M.J., Corvalan A.H., Chen X., Xu Z., El-Rifai W. Integrated analysis of mouse and human gastric neoplasms identifies conserved microRNA networks in gastric carcinogenesis. Gastroenterology. 2019 Mar; 156(4): 1127–1139.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.052.
10. Celano M., Rosignolo F., Maggiano V., Pecce V., Iannone M., Russo D., Bulotta S. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. Int J Genomics. 2017; 7: 32–43. doi: 10.1155/2017/6496570.
11. Lai X., Wolkenhauer O., Vera J. Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 27; 44(13): 601935. doi: 10.1093/nar/gkw550.
12. Palkina N., Komina A., Aksenenko M., Moshev A., Savchenko A., Ruksha T. MiR-204 and miR-3065 exert antitumor effect on melanoma cells. Oncol Lett. 2018 Jun; 15(6): 8269–8280. doi: 10.3892/ol.2018.8443.
13. Toda H., Kurozumi S., Kijima Y., Idichi T., Shinden Y., Yamada Y., Arai T., Maemura K., Fujii T., Horiguchi J., Natsugoe S., Seki N. Molecular pathogenesis of triple-negative breast cancer based on microRNA expression signatures: antitumor miR-204-5p targets AP1S3. J Hum Genet. 2018 Dec; 63(12): 1197–1210. doi: 10.1038/s10038-018-0510-3.
14. Diaz-Martinez M., Benito-Jardón L., Alonso L., Koetz-Ploch L., Hernando E., Teixidó J. miR-204-5p and miR-211-5p Contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma. Cancer Res. 2018 Feb 15; 78(4): 1017–1030. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1318.

15. Галицкий В.А. Гипотеза о механизме инициации малыми РНК метилирования ДНК de novo и аллельного исключения. Цитология. 2008; 50(4): 277–286. [Halitskiy V.A. Hypothesis of the initiation of DNA methylation de novo and allelic exclusion by small RNA. Cytology. 2008; 50(4): 277–286. (in Russian)].

16. Wiking-Busch M., Ndiaye M., Liu X., Ahmad N. RNA interference-mediated knockdown of SIRT1 and/or SIRT2 in melanoma: Identification of downstream targets by large-scale proteomics analysis. J Proteomics. 2018 Jan 6; 170: 99–109. doi: 10.1016/j.jpro.2017.09.002.

17. Палкина Н.В., Комина А.В., Аксененко М.Б., Белоногов Р.Н., Лаврентьев С.Н., Рукша Т.Г. Жизнеспособность клеток меланомы B16 in vitro и токсичность ингибитора miR-204-5p (LNATM) in vivo при модуляции экспрессии miR-204-5p у мышей. Цитология. 2018; 60(3): 180–187. [Palkina N.V., Komina A.V., Aksenenko M.B., Belonogov R.N., Lavrentiev S.N., Ruksha T.G. Viability of melanoma B16 cells in vitro and toxicity evaluation after miR-204-5p (LNATM) inhibitor application for the miR-204-5p expression modulation in mice in vivo. Cytology. 2018; 60(3): 180–187. (in Russian)].

18. Michan S., Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. Biochem J. 2007; (404): 1–13. doi: 10.1042/BJ20070140.

19. Chen J., Zhang B., Wong N., Lo A.W., To K.F., Chan A.W., Ng M.H., Ho C.Y., Cheng S.H., Lai P.B., Yu J., Ng H.K., Ling M.T., Huang A.L., Cai X.F., Ko B.C. Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. Cancer Res. 2011 Jun 15; 71(12): 4138–49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4274.

20. Wang F., Li H., Yan X.G., Zhou Z.W., Yi Z.G., He Z.X., Pan S.T., Yang Y.X., Wang Z.Z., Zhang X., Yang T., Qiu J.X., Zhou S.F. Alisertib induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition involving PI3K/Akt/mTOR and sirtuin 1-mediated signaling pathways in human pancreatic cancer cells. Drug Des Devel Ther. 2015 Jan 17; 9: 575–601. doi: 10.2147/DDDT.S75221.

21. Grbesa I., Pajares M.J., Martínez-Terroba E., Agorreta J., Mikecin A.M., Larráyoz M., Idoate M.A., Gall-Troselj K., Pio R., Montuenga L.M. Expression of Sirtuin 1 and 2 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. PLoS One. 2010; 10(4): e0124670. doi: 10.1371/journal.pone.0124670.

22. Lin Q., Mao Y., Song Y., Hyang D. MicroRNA-34a induces apoptosis in PC12 cells by reducing B-cell lymphoma 2 and sirtuin-1 expression. Mol Med Rep. 2015 Oct; 12(4): 5709–14. doi: 10.3892/mmr.2015.4185.

23. Gao J., Wang Y., Zhao X., Chen P., Xie L. MicroRNA-204-5p-mediated regulation of SIRT1 contributes to the delay of epithelial cell cycle traversal in diabetic corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jan 22; 56(3): 1493–504. doi: 10.1167/iovs.14-15913.

24. Liu J., Xu Y., Wu Q., Ding Q., Fan W., Liu J., Xu Y., Wu Q., Ding Q., Fan W. Sirtuin 1 protects hair follicle stem cells from TNF α -mediated inflammatory stress via activating the MAPK-ERK-Mfn2 pathway. Life Sci. 2018 1; 212: 213–224. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.003.

Поступила/Received 28.02.19
Принята в печать/Accepted 08.04.19

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дубовцева Ирина Юрьевна, аспирант кафедры патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (г. Красноярск, Россия). E-mail: dubovtseva14@yandex.ru. Researcher ID (WOS): S-9831-2018. ORCID: 0000-0003-0754-9955.

Аксененко Мария Борисовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 6958-9122. Researcher ID (WOS): V-1055-2017. Author ID (Scopus): 55330015100. ORCID: 0000-0001-7660-700X.

Рукша Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 5412-2148. Researcher ID (WOS): A-4801-2014. Author ID (Scopus): 23009925600. ORCID: 0000-0001-8142-4283.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00074П).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Irina Yu. Dubovtseva, Postgraduate student of the Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Health Care of the Russian Federation (Krasnoyarsk, Russia). E-mail: dubovtseva14@yandex.ru. Researcher ID (WOS): S-9831-2018. ORCID: 0000-0003-0754-9955.

Maria B. Akseenko, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, the Ministry of Health Care of the Russian Federation (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): V-1055-2017. Author ID (Scopus): 55330015100. ORCID: 0000-0001-7660-700X.

Tatiana G. Ruksha, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Health Care of the Russian Federation (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-4801-2014. Author ID (Scopus): 23009925600. ORCID: 0000-0001-8142-4283.

Funding

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project №14-15-00074).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.