

575.1

10.18522/2308-9709-2024-49-12

Вклад генетического варианта длинной некодирующей РНК *MALAT1* rs3200401 в развитие синдрома поликистоза яичников у женщин Ростовской области.

Деревянчук Е.Г., Али Руба, Аммар Манар, Романов Д.Е., Ломтева С.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Наличие полиморфного локуса *MALAT1*, rs3200401 и выявили его значимое отличие у женщин с СПКЯ ($X^2 = 3,5$ $p < 0,05$; OR = 2.18 (ДИ: 1.04-4.66). Анализ *in silico* показал, что замена нуклеотида с С на Т в локусе rs3200401 гена *MALAT1*, изменяет минимальную свободную энергию с - 46,40 до - 45,90 ккал/моль, что приводит к изменению и вторичной структуры длинной некодирующей РНК - *MALAT1*. Наличие полиморфного локуса rs3200401 гена длинной некодирующей РНК *MALAT1* показывает потенциальную ценность в прогнозировании патогенеза СПКЯ.

Ключевые слова: СПКЯ, поликистоз яичника, СПКЯ, rs3200401, *MALAT1*, длинные некодирующие РНК

10.18522/2308-9709-2024-49-12

Contribution of the genetic variant of long non-coding RNA *MALAT1* rs3200401 to the development of polycystic ovary syndrome in women of the Rostov region.

Derevyanchuk E.G., Ali Ruba, Ammar Manar, Romanov D.E., Lomteva S.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

The presence of the polymorphic locus *MALAT1*, rs3200401 and revealed its significant difference in women with PCOS ($X^2 = 3.5$ $p < 0.05$; OR = 2.18 (CI: 1.04-

4.66). In silico analysis showed that the substitution of nucleotide from C to T in the locus rs3200401 of the gene *MALAT1* changes the minimum free energy from - 46.40 to - 45.90 kcal / mol, which leads to a change in the secondary structure of the long non-coding RNA - MALAT1. The presence of the polymorphic locus rs3200401 of the gene long non-coding RNA *MALAT1* shows potential value in predicting the pathogenesis of PCOS.

Key words: PCOS, polycystic ovary syndrome, PCOS, rs3200401, *MALAT1*, long non-coding RNA

Введение

Длинные некодирующие РНК (LncRNA) в последние годы открываются как важнейшие регуляторы многих биологических процессов и путей. В настоящее время известно, что совокупность генов, кодирующих белки сильно подвержена регуляции эпигенетическими процессами, посредством которых молекулы длинных некодирующих РНК (lncRNA) могут регулировать экспрессию и активность соответствующих генов. В целом они контролируют экспрессию генов и клеточный цикл, включая механизмы ремоделирования хроматина и интерференции микроРНК для облегчения или ингибирования связывающего действия микроРНК с транскриптами-мишенями. Наконец, некоторые днРНК, экспрессируемые из энхансерных или сайленсерных областей, могут связываться с целевыми транскриптами и усиливать или ингибировать их последующую трансляцию (Amodio, N., 2018). В отличие от РНК, кодирующих ядерные белки, которые покидают ядро и используются только в качестве матрицы для синтеза белка, некодирующие ядерные РНК могут существовать исключительно внутри ядра на протяжении всей своей жизни. В геноме эукариот транскрибируется в десятки тысяч некодирующих РНК, что делает регуляторную систему клеток и организмов сложной для исследования. Длинные некодирующие РНК (днРНК) становятся критическим классом транскриптов, участвующих в широком спектре клеточных функций.

Среди длинных некодирующих РНК есть метастаз-ассоциированный транскрипт аденокарциномы легких 1 (MALAT1), он эволюционно-консервативен у млекопитающих и контролирует такие клеточные процессы, как пролиферация, миграция, инвазия, ангиогенез и апоптоз как в физиологических, так и в патологических состояниях. Роль MALAT1 в женской репродуктивной системе активно изучается. В микросреде яичников физиологическая экспрессия MALAT1 потенциально модулирует фолликулогенез, в то время как ее повышенная регуляция способствует метастазированию эпителиального рака яичников. Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) является одним из наиболее распространенных репродуктивных эндокринных метаболических расстройств. Сообщается, что транскрипт 1 аденокарциномы легких, ассоциированной с метастазами (MALAT1), может регулировать репродуктивную систему. Длинная некодирующая РНК MALAT1 была обнаружена в ранних фолликулах яичников, где она может функционировать как губка для miRNA или как конкурирующая эндогенная РНК, минимизируя доступность miRNA для их целевых мРНК (Wang, H., 2021; Adu-Gyamfi E. A. et al., 2024).

Ген транскрипта 1, связанного с метастазами аденокарциномы легких (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 - *MALAT1*) представляет собой одну из наиболее изученных длинных некодирующих РНК. *MALAT1* локализованный на хромосоме 11q13 у человека, и имеет длину 8,7 кб. MALAT1 функционирует преимущественно в ядре, осуществляя регуляцию транскрипции генов (Zhang et al., 2018), играет ключевую роль в формировании и метастазировании опухолей (Ji, P et al., 2003; Li et al., 2018 Bhat, e.a., 2024). Недавние исследования выявили участие MALAT1 в стимулировании накопления липидов в печени (Yan et al., 2016) и воспаления, вызванного гипергликемией (Li et al., 2024). Показано, что экспрессия *MALAT1*

регулируется такими факторами, как окислительный/метаболический стресс. MALAT1 блокирует активацию Nrf2, что приводит к увеличению антиоксидантного механизма и снижению продукции ROS у мышей с нулевым *MALAT1* (Chen, J.; e.a., 2018). При более высокой экспрессии *MALAT1* не может проникать внутрь ядра, что приводит к снижению антиоксидантных ферментов и генерации ROS.

Наличие полиморфизмов одиночных нуклеотидов может напрямую или косвенно влиять на уровни экспрессии *MALAT1* регулируя развитие синдрома поликистозных яичников.

Целью данного исследования было изучение вклада генетического варианта длинной некодирующей РНК *MALAT1* rs3200401 в развитие синдрома поликистоза яичников у женщин Ростовской области.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы крови 66 женщин с СПКЯ и 115 женщин контрольной группы, которые проходили процедуру экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в Центре репродукции человека и ЭКО (Ростов-на-Дону, Россия). В основную группу включены женщины с диагнозом "синдром поликистозных яичников", который был установлен в соответствии с Роттердамскими критериями. Диагноз ставился при наличии у пациентки не менее двух из следующих трех критериев: 1)- Гиперандрогенизм, подтвержденный клинически или биохимически, 2)- Олиго- или ановуляция, 3)- Морфология поликистозных яичников, подтвержденная УЗИ, с наличием > 12 фолликулов (2-9 мм в диаметре) в каждом яичнике или 20 антральных фолликулов в обоих яичниках, или увеличенный яичник объемом (> 10 мл). Контрольную группу составили женщины, проходившие процедуру ЭКО/ИКСИ в связи с бесплодием по трубному фактору или мужским

бесплодием. Все женщины, принявшие участие в нашем исследовании, дали свое информированное согласие.

Генотипирование геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови проводилось для анализа полиморфных вариантов генов. Для выделения геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови использовали наборы реагентов «ДНК-ЭКСТРАН» (Синтол, Россия). Аллель-специфическую ПЦР проводили с использованием коммерческих наборов реагентов «SNP-Screen» от (Синтол, Россия) с помощью системы ПЦР в реальном времени. Статистические расчеты проводились с использованием программы «GraphPad Prism 7». Для анализа распределения частот генотипов с учетом ожидаемых значений в соответствии с Харди-Вайнберга использовался критерий Хи-квадрат (χ^2).

Для оценки потенциального влияния альтернативного аллеля изученного полиморфного варианта гена длинной некодирующей РНК *MALAT1* (rs3200401) на вторичную структуру соответствующего ему транскрипта был проведен биоинформатический анализ *in silico*. Этот анализ проводился с использованием веб-сервера [RNAfold](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Результаты исследований

В таблице 1 представлены частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs3200401 в первом экзоне гена *MALAT1* в лейкоцитах периферической крови женщин с синдромом поликистоза яичника. Мы обнаружили статистическую различию в частотах генотипов и аллелей полиморфного локуса (*rs3200401*) гена *MALAT1* между пациентами с СПКЯ и контрольной группой. В группе СПКЯ частоты генотипов ТТ, СТ и СС составили 15,2 %, 31,8 %, и 53,0 % соответственно. Генотип СС, по-видимому, более

распространен в контрольной группе, в то время как генотип ТТ чаще встречался у женщин с СПКЯ.

Таблица 1 - Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs3200401 гена MALAT1 в лейкоцитах периферической крови

Полиморфный локус		СПКЯ Абс (%)	Контроль Абс (%)	P-значение	ОШ (95% ДИ)
MALAT (rs3200401)	Генотип				
	ТТ	10 (15,2)	7 (6,1)		
	СТ	21 (31,8)	25 (21,7)		
	СС	35 (53,0)	83 (72,2)		
				0,0056	2,18 (1,04-4,26)
	Аллель				
	Т	41 (31,1)	39 (16,9)	-	
С	91 (68,9)	191 (83,1)	0,0029	2,207 (1,33-3,65)	

На рисунке 1 представлено распределение полиморфного локуса rs3200401 гена MALAT1 в разных популяциях мира по данным проекта (1000 Genomes), частота минорного аллеля Т в общей популяции мира составляет 14 %, нами было зарегистрировано распределение в контрольной группе 16,9%, (таблица 1). У жителей Европы частота минорного аллеля Т составляет 20%, почти в два раза ниже этот аллель встречается в африканских и южно-азиатских популяциях.

Population genetics ⓘ

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



Рис. 1 Распределение полиморфного локуса rs3200401 гена MALAT1 в разных популяциях мира (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens)

Биоинформатический анализ оценки потенциального влияния альтернативного аллеля на вторичную структуру транскрипта показал, что замена аллелей с С в Т полиморфного локуса rs3200401 может изменить минимальную свободную энергию с - 46,40 до - 45,90 ккал/моль, что приводит к изменению вторичной структуры MALAT1 (рис. 2). При анализе базы данных SNPIncRNA было выявлено, что rs3200401 приводит к потере связывания с микроРНК hsa-miR-1324 и hsa-miR-3661, что оказывает влияние на взаимодействие и функциональность MALAT1. Эти выводы были подтверждены в исследовании Мяо и его коллег (Miao et al., 2018), что позволяет предположить, что замена С > Т в полиморфном локусе rs3200401 может изменить структуру транскрипта *MALAT1* и, следовательно, привести к потере сайта связывания микроРНК hsa-miR-1324 в этой lncRNA. МакКаун и соавт (McCown et al., 2019), демонстрировали, используя программное обеспечение RNAfold, что rs3200401 снижает стабильность шпилечного домена MALAT1, что подразумевает, что miR-217-5p не может так легко получить доступ к своему сайту связывания на MALAT1.

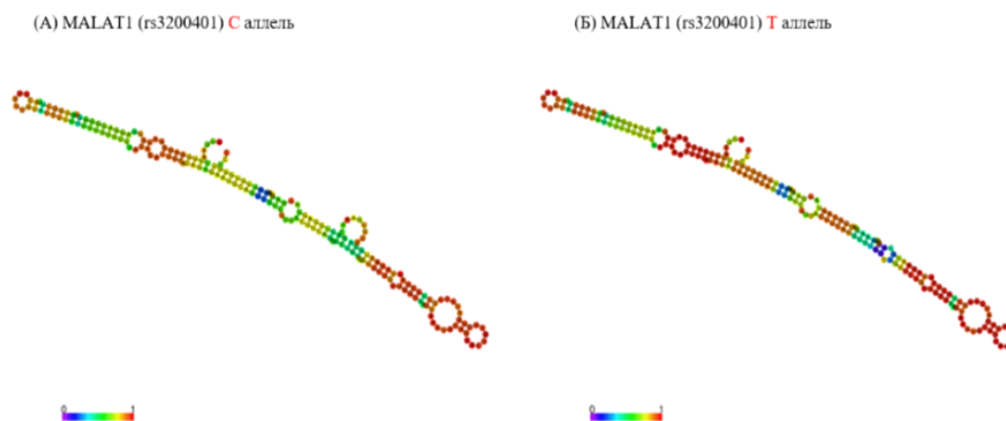


Рис.2 Предсказанные MFE вторичные структуры lncRNA MALAT1 по аллелям rs3200401. (А) MFE вторичные структуры основного аллеля С. (Б) MFE вторичные структуры минорного аллеля Т.

Структура окрашена по вероятности сопряжения оснований.

При анализе базы данных SNP-lncRNA было выявлено, что rs3200401 приводит к потере связывания с микроРНК hsa-miR-1324 и hsa-miR-3661, что оказывает влияние на взаимодействие и функциональность MALAT1. Эти выводы были подтверждены в исследовании Мяо и его коллег (Miao et al., 2018), что позволяет предположить, что замена С > Т в полиморфном локусе rs3200401 может изменить структуру MALAT1 и, следовательно, привести к потере сайта связывания микроРНК hsa-miR-1324 в этой lncRNA. МакКаун и соавт (McCown et al., 2019), демонстрировали, используя программное обеспечение RNAfold, что rs3200401 снижает стабильность шпилечного домена MALAT1, что подразумевает, что miR-217-5p не может так легко получить доступ к своему сайту связывания на MALAT1.

Заключение

MALAT1 расположен на длинном плече хромосомы 11: 65 497 688–65 506 516 на прямой цепи в соответствии с версией генома человека GRCh38.p14. Изучаемый некодирующий транскрипт-вариант (С/Т) расположен в позиции 11: 65504361 с предковым нуклеотидом «С», замененным на альтернативный (минорный аллель) «Т» и находится в первом экзоне транскрипта. Функциональные категории для полиморфного локуса rs3200401 гена MALAT1 представлена на рисунке 3.

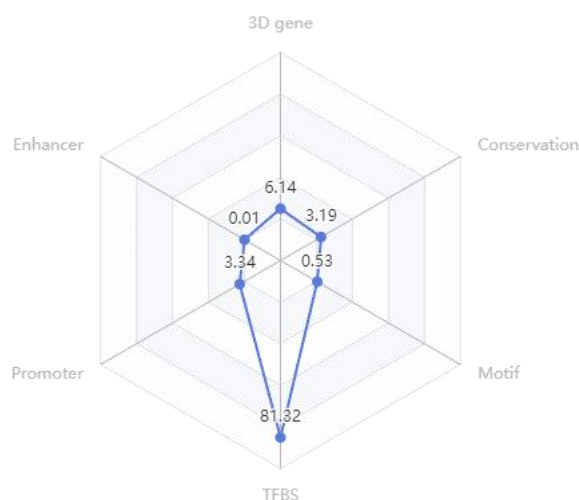


Рис.3. Радарная диаграмма распределения шести оценок полиморфного локуса rs3200401 гена MALAT1

(<https://omic.tech/3dsnpv2/detail.do?name=rs3200401&chrom=chr11>)

Как видно из рисунка 3 полиморфный локус rs3200401 гена *MALAT1* связан с 16 генами через петли хроматина (на рисунке его оценка функциональности 6.14); он находится в промоторе в 8 типах клеток (оценка 3.34), в 71 сайте связывания транскрипционных факторов (оценка 81.32). Общая оценка функциональности для этого SNP составляет 94,53. Локус rs3200401 гена *MALAT1* имеет статус открытого хроматина для более чем 750 000 потенциальных цис-регуляторных элементов (cCRE) в 54 различных типах клеток (<https://omic.tech>). Исходя из этих функциональных характеристик изучаемого нами полиморфного локуса rs3200401 гена *MALAT1* можно предположить что наличие минорного аллеля Т будет ассоциировано с значительным числом разнообразных патофизиологических процессов в различных тканях и типах клеток человека. Ранее была выявлена ассоциация между полиморфным вариантом rs3200401 и риском развития ожирения (Shkurat et al., 2023). Механизмы влияния этого генетического варианта включают в себя нарушение регуляции инсулина, а также метаболизма липидов

и глюкозы (Liu et al., 2018; Ghaedi et al., 2018). Было обнаружено, что локус rs3200401 гена *MALAT1* ассоциирован с повышенным уровнем триглицеридов (Li et al., 2024 Khan, M. M., & Kirabo, A. (2024)). Мы исследовали полиморфный локус rs3200401 первого экзона гена длинной некодирующей РНК *MALAT1* у пациентов с синдромом поликистоза яичников в системе «случай-контроль» и обнаружили потенциальную ценность rs3200401 *MALAT1* в прогнозировании СПКЯ.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23–15-00464.

Список литературы

1. Adu-Gyamfi, E. A., Cheeran, E. A., Salamah, J., & Lee, B. K. (2024). Mechanistic actions of long non-coding RNA MALAT1 within the ovary and at the fetomaternal interface. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 301.
2. Amodio, N.; Stamato, M.A.; Juli, G.; Morelli, E.; Fulciniti, M.; Manzoni, M.; Taiana, E.; Agnelli, L.; Cantafio, M.E.G.; Romeo, E.; et al. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity. *Leukemia* **2018**, 32, 1948–1957.
3. Bhat, A. A., Afzal, O., Afzal, M., Gupta, G., Thapa, R., Ali, H., ... & Subramaniyan, V. (2024). MALAT1: A key regulator in lung cancer pathogenesis and therapeutic targeting. *Pathology-Research and Practice*, 253, 154991.
4. Chen, J.; Ke, S.; Zhong, L.; Wu, J.; Tseng, A.; Morpurgo, B.; Golovko, A.; Wang, G.; Cai, J.J.; Ma, X.; et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates generation of reactive oxygen species and the insulin responses in male mice. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, 152, 94–103.

5. Ernst E.H., Nielsen J., Ipsen M. Villesen P., Lykke-Hartmann K. Transcriptome analysis of long non-coding RNAs and genes encoding paraspeckle proteins during human ovarian follicle development *Front. Cell Dev. Biol.*, 6 (78) (2018), p. 78.
6. Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., ... & Müller-Tidow, C. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 22(39), 8031-8041.
7. Khan, M. M., & Kirabo, A. (2024). Long Noncoding RNA MALAT1: Salt-Sensitive Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5507.
8. Li, S., Li, Y., Yan, X., Zhao, S., Yang, Z., Wang, Y., ... & Chen, Z. J. (2024). MALAT1 expression in granulosa cells in PCOS patients with different phenotypes. *Scientific Reports*, 14(1), 5019.
9. Li, Z. X., Zhu, Q. N., Zhang, H. B., Hu, Y., Wang, G., & Zhu, Y. S. (2018). MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer management and research*, 6757-6768.
10. Liu C. Long noncoding RNA H19 interacts with polypyrimidine tract-binding protein 1 to reprogram hepatic lipid homeostasis / C. Liu, Z. Yang, J. Wu [et al.] // *Hepatology*. – 2018. – Vol. 67, №. 5. – P. 1768-1783. doi:10.1002/HEP.29654.
11. McCown P. J. Secondary structural model of human MALAT1 reveals multiple structure–function relationships / P. J. McCown, M. C. Wang, L. Jaeger [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20, №. 22. – P. 5610.
12. Miao Y. R. lncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs / Y. R. Miao, W. Liu, Q. Zhang [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2018. – Vol. 46, №. D1. – P. D276-D280. doi:10.1093/NAR/GKX1004.
13. Shkurat T. P. The Role of Genetic Variants in the Long Non-Coding RNA Genes MALAT1 and H19 in the Pathogenesis of Childhood Obesity / T. P. Shkurat, M. Ammar, O. Bocharova [et al.] // *Non-coding RNA*. – 2023. – Vol. 9, №. 2. – P. 22.

14. Teng, L., & Meng, R. (2019). Long non-coding RNA MALAT1 promotes acute cerebral infarction through miRNAs-mediated hs-CRP regulation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 69, 494-504.
15. Wang, H., Zhang, Y., Guan, X., Li, X., Zhao, Z., Gao, Y., ... & Chen, R. (2021). An integrated transcriptomics and proteomics analysis implicates lncRNA MALAT1 in the regulation of lipid metabolism. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20.
16. Zhang Z. C. Targeting LncRNA-MALAT1 suppresses the progression of osteosarcoma by altering the expression and localization of β -catenin / Z. C. Zhang, C. Tang, Y. Dong [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2018b. – Vol. 9, №. 1. – P. 71. doi:10.7150/JCA.22113.
17. J. Zhen, J. Li, X. Li, X. Wang, Y. Xiao, Z. Sun, Q. Yu Downregulating lncRNA NEAT1 induces proliferation and represses apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome via microRNA-381/IGF1 axis *J. Biomed. Sci.*, 28 (1) (2021), p. 53,
18. Yan C. Long noncoding RNA MALAT1 promotes hepatic steatosis and insulin resistance by increasing nuclear SREBP-1c protein stability / C. Yan, J. Chen, N. Chen // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6, №. 1. – P. 22640. doi:10.1038/SREP22640.

Статья поступила в редакцию 17 июля 2024 г.

Поступила после доработки 29 августа 2024 г.

Принята к печати 12 сентября 2024 г.

Received 17, 2024 July

Revised 29, August, 2024

Accepted 12, September, 2024