

ИЗОФОРМЫ МИКРОРНК MIR-148A И MIR-203A ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО ИГРАЮТ РОЛЬ СУПРЕССОРОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

С. А. Нерсисян^{1,2} ✉

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Изоформы микроРНК — класс коротких некодирующих РНК, осуществляющих регуляцию экспрессии генов. Изоформы микроРНК отличаются от канонических микроРНК несколькими нуклеотидами на концах молекулы, причем вариации с 5'-концов микроРНК изменяют множество генов-мишеней. Целью работы было провести анализ функциональной активности 5'-изоформ микроРНК в тканях колоректального рака. Мишени 5'-изоформ микроРНК были предсказаны с помощью биоинформатических программ miRDB и TargetScan. Полученные данные о мишенях 5'-изоформ микроРНК были интегрированы с данными секвенирования мРНК и изоформ микроРНК образцов первичных колоректальных опухолей проекта The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma. Для построения сети взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов по интегрированным данным использовали алгоритм miRGTF-net. Показано, что высокоэкспрессированные при колоректальном раке изоформы микроРНК, различающиеся одним нуклеотидом на 5'-конце молекулы, имеют не более 30% общих мишеней. В регуляторной сети взаимодействий выявлены наиболее активные изоформы микроРНК. Уровни экспрессий канонической микроРНК hsa-miR-148a-3p и ее предсказанных мишеней, являющихся регуляторами клеточной пролиферации (*CSF1*, *ETS1*, *FLT1*, *ITGA5*, *MEIS1*, *MITF*, *RUNX2*), были значимо отрицательно коррелированы, откуда может следовать противоопухолевая роль данной молекулы. Каноническая микроРНК hsa-miR-203a-3p и ее 5'-изоформа были антикоррелированы с различными генами-мишенями, но при этом обе потенциально подавляли экспрессию генов, вовлеченных в эпителиально-мезенхимный переход: *SNAI2* и *TNC*.

Ключевые слова: изоформы микроРНК, колоректальный рак, регуляторные сети, miRGTF-net, TCGA

Финансирование: исследование осуществлено в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

Благодарности: Алексею Галатенко из лаборатории молекулярной физиологии НИУ ВШЭ за критику авторских идей и ценные замечания.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Ашотович Нерсисян
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117312, Россия; snersisyan@hse.ru

Статья получена: 29.04.2022 **Статья принята к печати:** 22.05.2022 **Опубликована онлайн:** 30.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.028

ISOFORMS OF MIR-148A AND MIR-203A ARE PUTATIVE SUPPRESSORS OF COLORECTAL CANCER

Nersisyan SA^{1,2} ✉

¹ National Research University Higher School of Economics (HSE), Moscow, Russia

² Institute of Molecular Biology (IMB) of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

MicroRNAs are short non-coding molecules which regulate translation in a gene-specific manner. MicroRNA isoforms that differ by few extra or missing nucleotides at the 5'-terminus (5'-isomiR) show strikingly different target specificity. This study aimed to identify functional roles of 5'-isomiR in colorectal cancers. Transcriptomic targets of microRNA isoforms were predicted using bioinformatics tools miRDB and TargetScan. The sets of putative targets identified for 5'-isomiR were integrated with mRNA and microRNA sequencing data for primary colorectal tumors retrieved from The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) database. The network of interactions among miRNA, their targets and transcription factors was built using the miRGTF-net algorithm. The results indicate that microRNA isoforms highly expressed in colorectal cancer and differing by a single nucleotide position at the 5'-terminus have ≤ 30% common targets. The regulatory network of interactions enables identification of the most engaged microRNA isoforms. Anti-correlated expression levels of canonical microRNA hsa-miR-148a-3p and its putative targets including *CSF1*, *ETS1*, *FLT1*, *ITGA5*, *MEIS1*, *MITF* and *RUNX2* proliferation regulators suggest an anti-tumor role for this molecule. The canonical microRNA hsa-miR-203a-3p and its 5'-isoform bind different sets of anti-correlated putative targets, although both of them interact with genes involved in the epithelial-mesenchymal transition: *SNAI2* and *TNC*.

Keywords: isomiR, colorectal cancer, regulatory networks, miRGTF-net, TCGA

Funding: the study was supported by HSE Basic Research Program.

Acknowledgement: the author thanks Aleksey Galatenko of the HSE Laboratory of Molecular Physiology for the fruitful critique and valuable comments.

Compliance with ethical standards: the study complies with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan A. Nersisyan
Vavilova, 7, Moscow, 117312, Russia; snersisyan@hse.ru

Received: 29.04.2022 **Accepted:** 22.05.2022 **Published online:** 30.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.028

МикроРНК — семейство коротких некодирующих РНК, осуществляющих пост-транскрипционную регуляцию экспрессии генов [1]. Необходимым условием для связывания микроРНК с мРНК является комплементарность seed-региона микроРНК (2-7 нуклеотиды с 5'-конца) с последовательностью мРНК-мишени [2]. В результате такого связывания происходит остановка трансляции мРНК или же ее деградация, причем вероятность деградации

напрямую связана с количеством комплементарных связей за пределами seed-региона [2]. Хорошо известно, что молекулы микроРНК могут играть роль как опухолевых супрессоров, так и онкогенов для множества видов рака [3–5].

В ходе созревания микроРНК ферменты Drosha и Dicer могут неточно осуществлять обрезку шпильки при-микроРНК, в результате чего образуются изоформы

микроРНК, отличающиеся от канонической микроРНК несколькими нуклеотидами на концах молекулы [6]. Вариация длины микроРНК с 5'-конца играет особую роль, так как при изменениях смещается seed-регион; таким образом, 5'-изоформы микроРНК обладают другим набором мишеней даже в случае изменения длины на один нуклеотид.

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место по частоте заболеваемости и второе по частоте летальных исходов среди онкологических заболеваний в мире [7]. Широко известны примеры участия микроРНК в механизмах прогрессии и метастазирования КРР. Например, семейство микроРНК miR-200 подавляет экспрессию генов *ZEB1*, *ZEB2*, кодирующих ключевые транскрипционные факторы (ТФ) для эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП) [8]. Соответственно, транскрипционное и/или эпигенетическое подавление экспрессии miR-200 способствует ЭМП и метастазированию рака [8]. Профили экспрессии молекул микроРНК активно используют также для поиска диагностических и прогностических маркеров КРР [9]. На сегодняшний день изучение роли изоформ микроРНК при КРР ограничено изучением их уровней экспрессии в опухолевых и здоровых тканях [10], при этом, насколько нам известно, функциональную активность 5'-изоформ микроРНК при КРР исследователи не анализировали.

Большое количество микроРНК и на порядок большее число порождаемых ими регуляторных взаимодействий (в среднем для одной микроРНК предсказано около 200 мишеней [1]) требуют применения биоинформатических подходов; один из наиболее распространенных методов — анализ регуляторных сетей. В рамках данного подхода молекулам микроРНК и генам ставят в соответствие вершины сети, а паре взаимодействующих молекул — ребро, соединяющее микроРНК и мишень [11]. Для построения регуляторных сетей традиционно используют два подхода: литературные базы данных взаимодействий и корреляционный анализ по выборке образцов с известной экспрессией мРНК и микроРНК. Нами ранее был разработан и программно реализован алгоритм miRGTF-net, позволяющий объединить эти два подхода и добавить в сеть другой класс регуляторных молекул — транскрипционных факторов [12]. Использование данного алгоритма позволяет максимально полно и достоверно описать ландшафт внутриклеточных взаимодействий в интересующем типе клеток/тканей.

Целью работы было выяснить функциональную роль 5'-изоформ микроРНК в тканях КРР, проанализировав их профиль экспрессии, предсказав мишени на основе нуклеотидных последовательностей и интегрировав полученные данные с данными активности ТФ с помощью алгоритма miRGTF-net.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предсказание мишеней изоформ микроРНК

Последовательности шпилек при-микроРНК и канонические позиции их разрезания ферментами Droscha и Dicer извлекали из базы данных miRBase версии 21 (<https://www.mirbase.org>). Для обозначения 5'-изоформ микроРНК использовали стандартную номенклатуру: число после вертикальной черты обозначает сдвиг позиции разрезания относительно канонического в направлении от 5'- к 3'-концу. Например, hsa-miR-10a-5p|+1 соответствует последовательности микроРНК hsa-miR-10a-5p без первого нуклеотида на 5'-конце молекулы.

Нуклеотидные последовательности микроРНК и их изоформ вводили в программы miRDB версии 6.0 [13] и TargetScan версии 7.2 [2] для определения мРНК-мишеней. Согласно рекомендациям разработчиком miRDB, выбирали предсказания с качеством связывания не менее 80. Число предсказаний TargetScan уравнивали с числом предсказаний miRDB, выбирая соответствующее число наиболее сильных взаимодействий для каждой изоформ микроРНК.

Сбор и анализ данных секвенирования мРНК и изоформ микроРНК

Публично доступные исходные данные секвенирования мРНК и изоформ микроРНК проекта The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) получали с портала GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Данные нормировали с помощью пакета edgeR версии 3.30.0 [14], использовали алгоритм нормализации Trimmed Mean of M-values (TMM), в результате получили таблицы Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (TMM-RPKM) для экспрессии мРНК и Reads Per Million mapped reads (TMM-RPM) — для экспрессии микроРНК.

Таблицу экспрессии 5'-изоформ микроРНК сортировали по суммарной экспрессии в рассматриваемых образцах, после чего считали кумулятивную функцию распределения. Наименьшее число 5'-изоформ микроРНК, покрывающих 95% всех прочтений секвенирования, обозначали высокоэкспрессированными 5'-изоформами микроРНК и использовали для дальнейшего анализа.

Построение регуляторной сети взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов

Алгоритм miRGTF-net [12] использовали для построения регуляторной сети взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов. Основным преимуществом алгоритма является возможность интеграции данных экспрессии мРНК и изоформ микроРНК (TCGA-COAD) с биологическими базами данных:

- TRRUST версии 2 (<https://www.grnpedia.org/trrust/>): взаимодействия ТФ и генов;
- TransmiR версии 2 (<http://www.cuilab.cn/transmir>): взаимодействия ТФ и микроРНК;
- miRDB, TargetScan: взаимодействия 5'-изоформ микроРНК и их мишеней (см. выше);
- miRIAD (<https://www.miriad-database.org>): коэкспрессия генов-хозяев и их интронных микроРНК.

Использовали каноническую последовательность шагов алгоритма miRGTF-net. Вкратце, сначала строили сеть на основе взаимодействий из баз данных. Затем для каждого ребра рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена по соответствующим значениям экспрессии TCGA-COAD. Ребра, соответствующие молекулам со слабо коррелированными уровнями экспрессии, удаляли (отсечку на абсолютное значение корреляции Спирмена выбирали по 0,9-квантили распределения корреляций). Кроме того, удаляли ребра, соединяющие положительно коррелированные изоформы микроРНК и их мишени и соединяющие отрицательно коррелированных генов-хозяев с их интронными микроРНК.

Далее оценивали силу линейной зависимости между экспрессией каждой вершины и ее прямыми регуляторами. Соответствующие линейные модели строили с помощью

гребневой регрессии. Качество моделей оценивали с помощью коэффициента детерминации R^2 , силу и направление регуляции оценивали с помощью стандартизованных β -коэффициентов регрессии. Для фильтрации вершин и ребер сети использовали пороговые значения, установленные в пакете miRGTF-net по умолчанию: модуль β -коэффициента не менее 0,3, 90% наибольших значений коэффициентов детерминации. Таким образом, полученная сеть содержала вершины, соответствующие как регуляторам экспрессии, так и регулируемым генам и изоформам микроРНК.

Поиск сильно связанных компонент в сети проводили с помощью пакета NetworkX версии 2.8 (<https://networkx.org>). Регуляторные сети визуализировали с помощью программ Gephi (<https://gephi.org>) и yED Graph Editor (yWorks GmbH; Германия).

Анализ обогащения по функциональной принадлежности

Для функциональной аннотации списков генов (мишеней 5'-изоформ микроРНК) использовали веб-сервис DAVID версии декабря 2021 г. [15] и аннотацию биологических путей Gene Ontology (GO) [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Профиль экспрессии изоформ микроРНК в образцах колоректального рака

Анализируемая выборка TCGA-COAD состояла из профилей экспрессии мРНК и 5'-изоформ микроРНК 426 образцов первичных опухолей КРР. Нами было выделено 55 высокоэкспрессированных изоформ микроРНК, 10 из которых составляли неканонические изоформы микроРНК (рис. 1). Были выявлены две неканонические 5'-изоформы микроРНК, на каждую из которых приходилось более 1% от тотальной экспрессии

микроРНК в рассматриваемых образцах: hsa-miR-192-5p|+1 (2,4%) и hsa-miR-10a-5p|+1 (1,3%).

Вариация последовательности микроРНК на ее 5'-конце меняет seed-регион молекулы, вследствие чего может меняться множество потенциальных генов-мишеней. Последовательности найденных канонических и неканонических изоформ микроРНК были использованы для биоинформатического предсказания их мишеней. Как и ожидалось, пары изоформ микроРНК, отличающихся на один нуклеотид с 5'-конца, имели слабо пересекающиеся множества мишеней (см. таблицу). Например, каноническая форма микроРНК hsa-miR-10a-5p и ее 5'-изоформа без первого нуклеотида имели всего 11 общих мишеней из 267 мишеней в объединении (4,1%). Максимальная доля общих мишеней была достигнута для микроРНК hsa-miR-29a-3p и ее более длинной изоформы: 246 общих мишеней, 788 мишеней в объединении (31,2%).

Регуляторная сеть взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов

Следующим шагом биоинформатического анализа было построение регуляторной сети взаимодействий в клетках КРР. Алгоритм miRGTF-net позволяет строить такие сети, интегрируя два типа данных: биологически обоснованные взаимодействия из баз данных и профили экспрессии мРНК и изоформ микроРНК в выборке образцов. Регуляторная сеть содержала взаимодействия четырех типов:

- ТФ, регулирующие экспрессию генов;
- ТФ, регулирующие экспрессию микроРНК;
- 5'-изоформы микроРНК, регулирующие экспрессию генов;
- коэкспрессию генов-хозяев и их интронных микроРНК.

Данные экспрессии мРНК и 5'-изоформ микроРНК в выборке TCGA-COAD использовали для выбора взаимодействий, подкрепленных значимой корреляцией в рассматриваемых образцах.

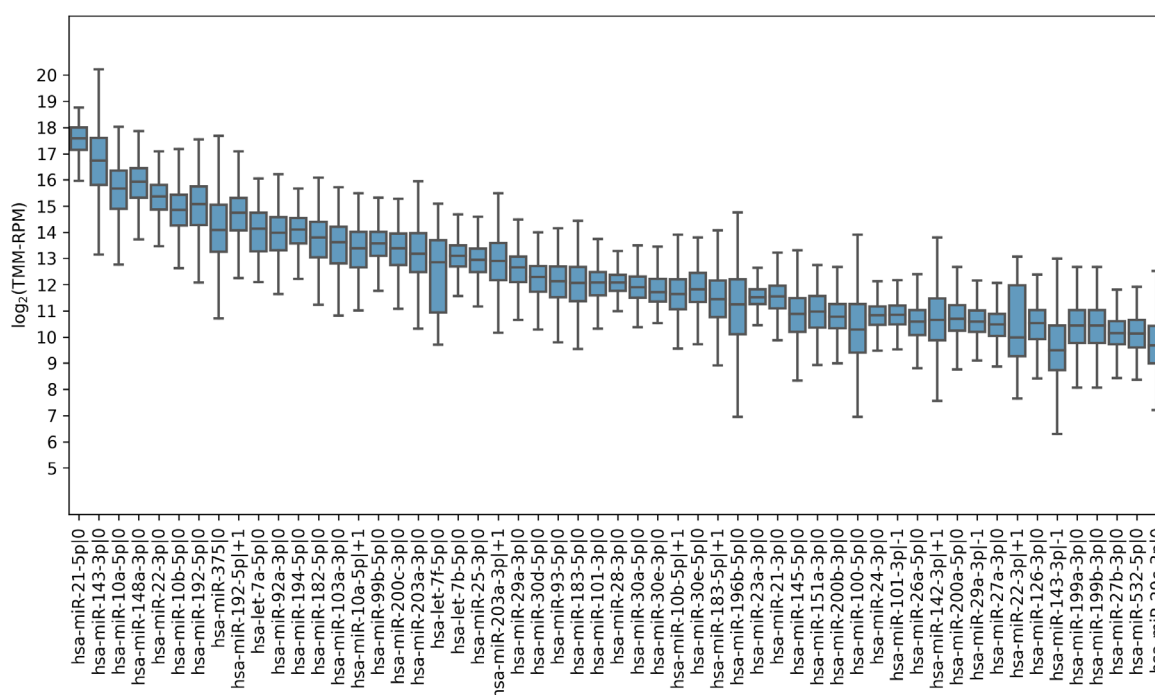


Рис. 1. Распределение экспрессии 55 наиболее экспрессированных 5'-изоформ микроРНК в выборке образцов колоректального рака. Горизонтальный отрезок внутри ящика отображает медиану распределения, границы ящиков соответствуют нижнему и верхнему квартилям, а вертикальные отрезки за пределами ящика продолжают до минимального и максимального значения экспрессии

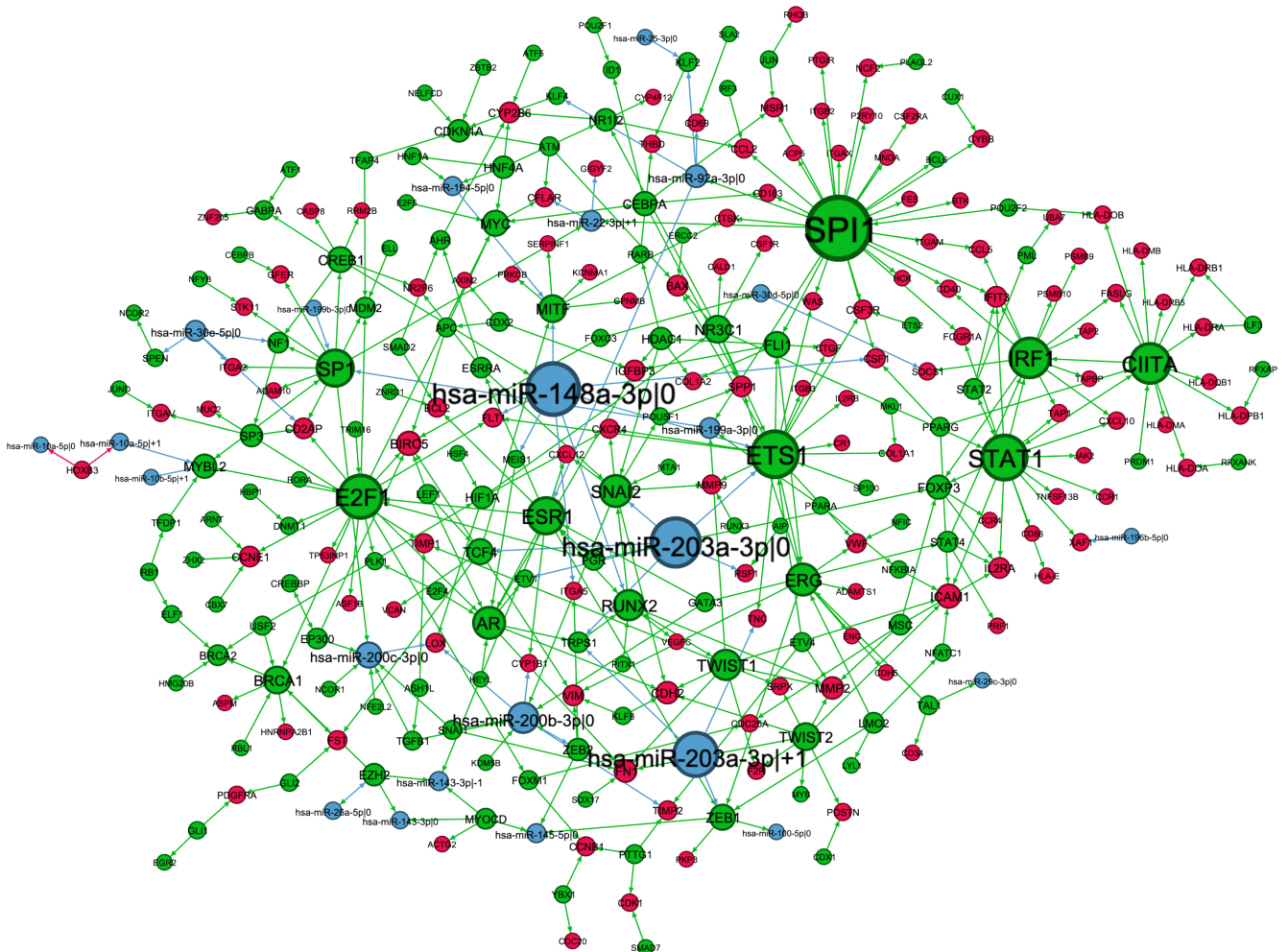


Рис. 2. Регуляторная сеть взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов. Синим, зеленым и красным цветом выделены 5'-изоформы микроРНК, транскрипционные факторы и гены, соответственно. Цвета ребер соответствуют цветам соответствующих регуляторов. Размеры вершин линейно соответствуют их степеням

Построенная сеть состояла из 333 молекул: 24 5'-изоформы микроРНК, 166 ТФ и 143 гена, не кодирующих ТФ (рис. 2). Из 456 взаимодействий 42 соответствовали подавлению экспрессии генов-мишеней изоформами микроРНК, 413 регуляции экспрессии генов и микроРНК с помощью ТФ и лишь одна пара ген-микроРНК соответствовала коэкспрессии генов-хозяина и интронной микроРНК: *HOXB3* и *hsa-miR-10a*.

Наибольшее число антикоррелированных мишеней (семь) было найдено для канонической микроРНК *hsa-miR-148a-3p*. Данный список состоял из известных онкогенов, включая регуляторы и маркеры пролиферации (*CSF1*, *ETS1*, *FLT1*, *MEIS1*, *MITF*, *RUNX2*, категория GO:0008284 “positive regulation of cell proliferation”) и молекулу из семейства интегринов *ITGA5*, участвующую в регуляции клеточной пролиферации, инвазии и миграции путем передачи сигнала в клетки [17]. Данная микроРНК тоже присутствовала в наибольшей компоненте сильной связности регуляторной сети (т. е. подсети, в которой существует ориентированный путь между двумя любыми вершинами), напрямую связанной с ЭМП и эстрогеновым сигнальным путем (рис. 3). Таким образом, микроРНК *hsa-miR-148a-3p* потенциально подавляет экспрессию проопухолевых генов, играя роль возможного опухолевого супрессора при КРП.

Второй по количеству регулируемых генов оказалась пара, состоящая из канонической микроРНК *hsa-miR-203a-3p|0*

и ее 5'-изоформы *hsa-miR-203a-3p|+1*. В то время как у данных молекул не было общих антикоррелированных мишеней, обе изоформы микроРНК выполняли единую функцию, потенциально подавляя экспрессию онкогенов. Так, экспрессия канонической микроРНК *hsa-miR-203a-3p|0* отрицательно коррелировала с экспрессией ТФ *SNAI2*, являющегося одним из драйверов ЭМП [18], а неканоническая 5'-изоформа *hsa-miR-203a-3p|+1* предположительно регулировала экспрессию белка внеклеточного матрикса, кодируемого геном *TNC*, который также играет ключевую роль в ЭМП при КРП [19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании с помощью биоинформатического анализа была рассмотрена функциональная активность 5'-изоформ микроРНК в злокачественных колоректальных опухолях. Показано, что изоформы микроРНК, отличающиеся одним нуклеотидом на 5'-конце молекулы, обладают слабо пересекающимися множествами генов-мишеней (31,2% максимум). В число наиболее активных регуляторов вошли *hsa-miR-148a-3p* (каноническая микроРНК), *hsa-miR-203a-3p|0* (каноническая микроРНК) и ее 5'-изоформа *hsa-miR-203a-3p|+1*. Интересно, что все три найденные микроРНК предположительно подавляли экспрессию проопухолевых генов, причем множества

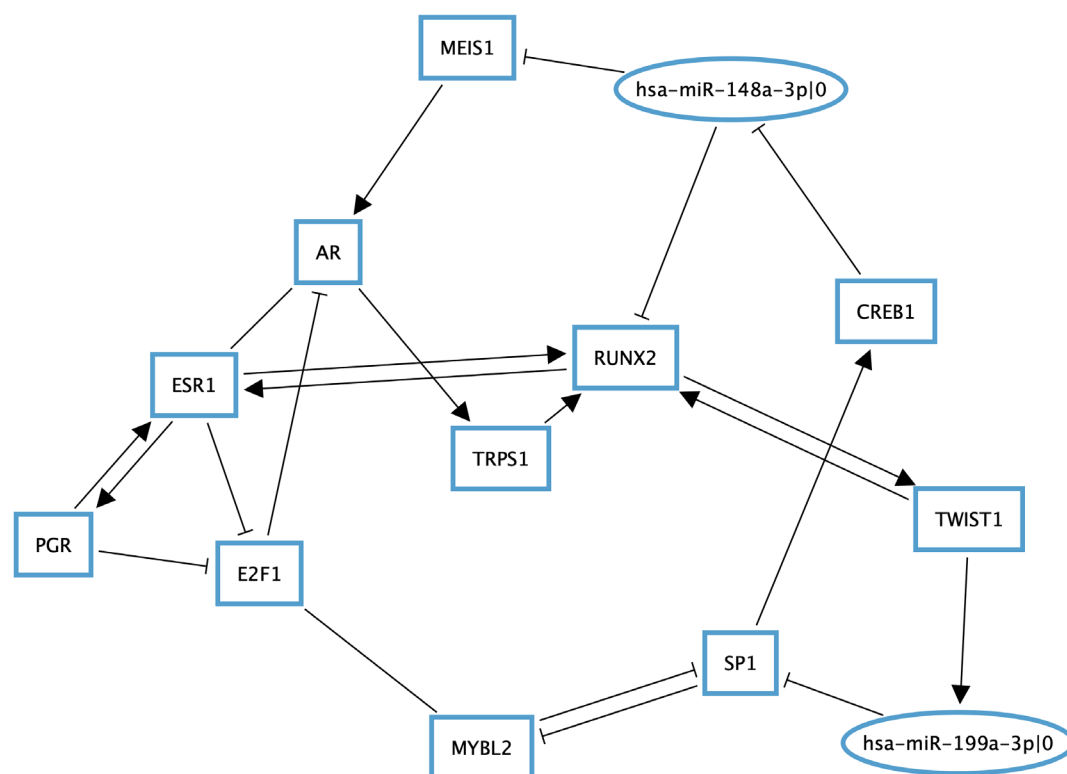


Рис. 3. Сильно связанная подсеть взаимодействий 5'-изоформ микроРНК и транскрипционных факторов. Эллипсами и прямоугольниками обозначены изоформы микроРНК и транскрипционные факторы соответственно. Стрелки обозначают активацию экспрессии, Т-образные линии обозначают подавление экспрессии

антикоррелированных мишеней канонической формы и 5'-изоформы miR-203a не пересекались.

Функциональную активность 5'-изоформ микроРНК ранее изучали в контексте рака молочной железы. Показано, что две 5'-изоформы микроРНК hsa-miR-183-5p оказывают различное влияние на транскриптом клеток MDA-MB-231, в частности, были найдены гены, опосредованно регулируемые изоформами в разных направлениях (*EGFR*, *NRAS*) [20]. По нашим данным, анализ мишени 5'-изоформ микроРНК при КРП проведен впервые.

Четыре из семи отобранных нами потенциальных мишеней hsa-miR-148a-3p были валидированы *in vitro* в ранее опубликованных исследованиях: *CSF1*, *ITGA5* [21], *MITF* [22], *RUNX2* [23]. Нами ранее было также обнаружено, что гипоксия клеточных линий КРП HT-29 и *Saco-2* приводила к подавлению экспрессии микроРНК hsa-miR-148a-3p, что влекло за собой повышение экспрессии гена-мишени *ITGA5* [24]. В ряде других работ показано,

что miR-148a оказывает проапоптотическое действие и ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток КРП, подавляя экспрессию *Bcl-2* [25], *ErbB3* [26] и *WNT10b* [27]. Помимо КРП, роль hsa-miR-148a-3p в качестве супрессора пролиферации опухолевых клеток была показана в контексте раков молочной железы, простаты и уротелия [28]. Таким образом, полученные нами данные о противоопухолевой роли miR-148a хорошо согласуются с существующей литературой.

Аналогичную картину можно наблюдать для канонической формы микроРНК miR-203a: предсказанное нами взаимодействие miR-203a и *SNAI2* было ранее валидировано *in vitro* [29], оверэкспрессия miR-203a в клеточных линиях КРП приводила к ингибированию инвазии и миграции клеток [30]. Таким образом, выявленные нами потенциальные мишени неканонической изоформы микроРНК hsa-miR-203a-3p|+1 согласуются с известными фактами о функциональной активности канонической микроРНК.

Таблица. Число предсказанных мишеней высокоэкспрессированных канонических микроРНК и соответствующих 5'-изоформ

| Каноническая микроРНК | 5'-изоформа | Каноническая микроРНК, число мишеней | 5'-изоформа, число мишеней | Число общих мишеней |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| hsa-miR-10a-5p 0 | hsa-miR-10a-5p +1 | 175 | 103 | 11 |
| hsa-miR-10b-5p 0 | hsa-miR-10b-5p +1 | 173 | 102 | 12 |
| hsa-miR-22-3p 0 | hsa-miR-22-3p +1 | 235 | 235 | 42 |
| hsa-miR-29a-3p 0 | hsa-miR-29a-3p -1 | 671 | 363 | 246 |
| hsa-miR-101-3p 0 | hsa-miR-101-3p -1 | 632 | 694 | 267 |
| hsa-miR-142-3p 0 | hsa-miR-142-3p +1 | 254 | 359 | 33 |
| hsa-miR-143-3p 0 | hsa-miR-143-3p -1 | 351 | 205 | 118 |
| hsa-miR-183-5p 0 | hsa-miR-183-5p +1 | 366 | 396 | 63 |
| hsa-miR-192-5p 0 | hsa-miR-192-5p +1 | 68 | 76 | 16 |
| hsa-miR-203a-3p 0 | hsa-miR-203a-3p +1 | 573 | 676 | 256 |

ВЫВОДЫ

Применение методов построения и анализа регуляторных сетей взаимодействий позволило нам определить роль функциональной активности некоторых 5'-изоформ микроРНК в клетках колоректального рака. Показано, что 5'-изоформы микроРНК hsa-miR-203a-3p могут

регулировать различные гены-мишени, играя при этом схожую антиопухолевую роль. Дальнейшие экспериментальные исследования, например, сверхэкспрессия 5'-изоформ hsa-miR-203a-3p и других микроРНК *in vitro* и *in vivo*, необходимы для понимания молекулярных механизмов развития и прогрессирования колоректальных опухолей.

Литература

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120 (1): 15–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477>.
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015; 4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26267216>.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*. 2009; 60 (1): 167–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630570>.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. Post-Processing Algorithm for miRNA Microarray Data. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059403>.
- Turchinovich A, Tonevitsky AG, Cho WC, Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. *Front Mol Biosci*. 2015; 2 (APR): 11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988178>.
- Zhiyanov A, Nersisyan S, Tonevitsky A. Hairpin sequence and structure is associated with features of isomiR biogenesis. *RNA Biol*. 2021; 18 (sup1): 430–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34286662>.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (3): 209–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338>.
- Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer*. 2013; 132 (4): 745–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753312>.
- Chen B, Xia Z, Deng Y-N, Yang Y, Zhang P, Zhu H, et al. Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol*. 2019; 9 (1): 180212. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958116>.
- Zelli V, Compagnoni C, Capelli R, Corrente A, Comice J, Vecchiotti D, et al. Emerging Role of isomiRs in Cancer: State of the Art and Recent Advances. *Genes (Basel)* 2021; 12 (9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34573429>.
- Galatenko VV, Galatenko AV, Samatov TR, Turchinovich AA, Shkurnikov MY, Makarova JA, et al. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 2418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29402894>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Galatenko V, Shkurnikov M, Tonevitsky A. miRGTF-net: Integrative miRNA-gene-TF network analysis reveals key drivers of breast cancer recurrence. *PLoS One*. 2021; 16 (4): e0249424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33852600>.
- Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48 (D1): D127–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31504780>.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>.
- Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35325185>.
- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (D1): D325–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33290552>.
- Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18 (9): 533–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30002479>.
- Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, Steinbichler TB, Riechelmann H. Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells*. 2020; 9 (2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059478>.
- Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, et al. Tumor-derived tenascin-C promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 2013; 33 (5): 1927–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645740>.
- Telonis AG, Loher P, Jing Y, Londin E, Rigoutsos I. Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43 (19): 9158–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400174>.
- Cimino D, De Pittà C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, et al. miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J*. 2013; 27 (3): 1223–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233531>.
- Hafliadóttir BS, Bergsteinsdóttir K, Praetorius C, Steingrímsson E. miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PLoS One*. 2010; 5 (7): e11574. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644734>.
- Liu H, Su H, Wang X, Hao W. MiR-148a regulates bone marrow mesenchymal stem cells-mediated fracture healing by targeting insulin-like growth factor 1. *J Cell Biochem*. 2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30335895>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Chekova M, Tonevitsky A. Hypoxia-induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. *Front Genet*. 2021; 12: 662468. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34135940>.
- Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Sheng H, et al. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2011; 18 (11): 1702–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455217>.
- Zhao W, Zheng J, Wei G, Yang K, Wang G, Sun X. miR-148a inhibits cell proliferation and migration through targeting ErbB3 in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019; 18 (3): 2530–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31402949>.
- Shi L, Xi J, Xu X, Peng B, Zhang B. MiR-148a suppressed cell invasion and migration via targeting WNT10b and modulating β -catenin signaling in cisplatin-resistant colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2019; 109: 902–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551544>.
- Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer*. 2016; 7 (10): 1233–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390598>.
- Ma X, Li L, Jia T, Chen M, Liu G, Li C, et al. miR-203a controls keratinocyte proliferation and differentiation via targeting the

stemness-associated factor Δ Np63 and establishing a regulatory circuit with SNAI2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 491 (2): 241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754589>.

References

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005; 120 (1): 15–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477>.
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015; 4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26267216>.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009; 60 (1): 167–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630570>.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. Post-Processing Algorithm for miRNA Microarray Data. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059403>.
- Turchinovich A, Tonevitsky AG, Cho WC, Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. *Front Mol Biosci.* 2015; 2 (APR): 11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988178>.
- Zhiyanov A, Nersisyan S, Tonevitsky A. Hairpin sequence and structure is associated with features of isomiR biogenesis. *RNA Biol.* 2021; 18 (sup1): 430–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34286662>.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71 (3): 209–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338>.
- Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132 (4): 745–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753312>.
- Chen B, Xia Z, Deng Y-N, Yang Y, Zhang P, Zhu H, et al. Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol.* 2019; 9 (1): 180212. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958116>.
- Zelli V, Compagnoni C, Capelli R, Corrente A, Cornice J, Vecchiotti D, et al. Emerging Role of isomiRs in Cancer: State of the Art and Recent Advances. *Genes (Basel)* 2021; 12 (9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34573429>.
- Galatenko VV, Galatenko AV, Samatov TR, Turchinovich AA, Shkurnikov MY, Makarova JA, et al. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 2418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29402894>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Galatenko V, Shkurnikov M, Tonevitsky A. miRGTF-net: Integrative miRNA-gene-TF network analysis reveals key drivers of breast cancer recurrence. *PLoS One.* 2021; 16 (4): e0249424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33852600>.
- Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48 (D1): D127–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31504780>.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010; 26 (1): 139–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>.
- Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35325185>.
- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49 (D1): D325–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33290552>.
- Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18 (9): 533–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30002479>.
- Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, Steinbichler TB, Riechelmann H. Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells.* 2020; 9 (2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059478>.
- Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, et al. Tumor-derived tenascin-C promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 2013; 33 (5): 1927–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645740>.
- Telonis AG, Loher P, Jing Y, Londin E, Rigoutsos I. Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43 (19): 9158–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400174>.
- Cimino D, De Pittà C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, et al. miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J.* 2013; 27 (3): 1223–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233531>.
- Hafliadóttir BS, Bergsteinsdóttir K, Praetorius C, Steingrímsson E. miR-148 regulates Mif in melanoma cells. *PLoS One.* 2010; 5 (7): e11574. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644734>.
- Liu H, Su H, Wang X, Hao W. MiR-148a regulates bone marrow mesenchymal stem cells-mediated fracture healing by targeting insulin-like growth factor 1. *J Cell Biochem.* 2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30335895>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Chekova M, Tonevitsky A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. *Front Genet.* 2021; 12: 662468. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34135940>.
- Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Sheng H, et al. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ.* 2011; 18 (11): 1702–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455217>.
- Zhao W, Zheng J, Wei G, Yang K, Wang G, Sun X. miR-148a inhibits cell proliferation and migration through targeting ErbB3 in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2019; 18 (3): 2530–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31402949>.
- Shi L, Xi J, Xu X, Peng B, Zhang B. MiR-148a suppressed cell invasion and migration via targeting WNT10b and modulating β -catenin signaling in cisplatin-resistant colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109: 902–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551544>.
- Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer.* 2016; 7 (10): 1233–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390598>.
- Ma X, Li L, Jia T, Chen M, Liu G, Li C, et al. miR-203a controls keratinocyte proliferation and differentiation via targeting the stemness-associated factor Δ Np63 and establishing a regulatory circuit with SNAI2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 491 (2): 241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754589>.
- Qian Z, Gong L, Mou Y, Han Y, Zheng S. MicroRNA-203a-3p is a candidate tumor suppressor that targets thrombospondin 2 in colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2019; 42 (5): 1825–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31545460>.