

Алыбаева А.Ж., Ниязова Р.Е.,
Файе Б., Иващенко А.Т.

**Сайты связывания miRNA
с генами транскрипционных
факторов *Camelus ferus***

Alybaeva A., Niyazova R.,
Faye B., Ivashchenko A.

**Binding sites of miRNAs with
transcription factors genes of
*Camelus ferus***

Алыбаева А.Ж., Ниязова Р.Е.,
Файе В., Иващенко А.Т.

**MiRNAдың *Camelus ferus*
транскрипциялық факторлар-
дың гендерімен байланысу
сайттары**

В mRNA 63 генов из 157 генов транскрипционных факторов семейства zinc finger *Camelus ferus* предсказаны 239 сайтов связывания miRNA. В 5'UTR расположено 19 сайтов, в CDS имеется 64 сайта и в 3'UTR локализовано 156 сайтов. С mRNA гена GLI2 могут связываться восемь miRNA. Величина отношения $\Delta G/\Delta G_m$, характеризующая степень сродства miRNA к mRNA, изменялась от 90 до 100%. miR-1322 имеет по одному сайту связывания в mRNA генов-мишеней GLI1, HINFP, HIVEP1, MTF1, SALL4, SP1, ZNF335 и ZNF451, два сайта в ZNF142, три сайта в гене EGR1. Величина ΔG варьировала от -114,6 кДж/моль до -129,5 кДж/моль. Полученные характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA генов транскрипционных факторов семейства zinc finger *Camelus ferus* свидетельствуют о том, что биосинтез большинства из них может регулироваться с помощью miRNA.

Ключевые слова: mRNA, miRNA, транскрипционные факторы, *Camelus ferus*.

We searched 239 miRNAs binding sites in mRNAs of 63 from 157 transcription factors genes of *Camelus ferus* Zinc finger family. 19 binding sites are located in the 5'UTRs, 64 sites are located in the CDSs and 156 sites are located in the 3'UTRs. The mRNA of GLI2 gene has binding sites for eight miRNAs. The $\Delta G/\Delta G_m$ value changed from 90 to 100%. miR-1322 has one binding site in GLI1, HINFP, HIVEP1, MTF1, SALL4, SP1, ZNF335 and ZNF451 genes, two sites in ZNF142, three sites in EGR1 gene. The ΔG value varied from -114,6 kJ/mole to -138,0 kJ/mole. Some miRNAs with a length of 23 and 24 nucleotides also have a high value ΔG varied from -112,5 kJ/mole to -129,5 kJ/mole. The results show a strong interaction between the expression of genes of transcription factors and miRNAs.

Key words: mRNA, miRNA, transcription factors, *Camelus ferus*.

Camelus ferus Zinc finger отбасы транскрипциялық факторларының 157 ген ішінен 63 геннің mRNA-сында 239 miRNA-мен байланысу сайттар анықталған. 5'UTR-де 19 сайт, CDS-те 64 сайт және 3'UTR-де 156 сайттар орналасқан. GLI2 геннің mRNA-мен сегіз miRNA-ның байланысу сайттар бар. $\Delta G/\Delta G_m$ дәрежесі 90-нан 100% дейін өзгереді. miR-1322-ң GLI1, HINFP, HIVEP1, MTF1, SALL4, SP1, ZNF335 и ZNF451 нысана-гендерінің mRNA-да бір, ZNF142-да екі, EGR1 генінде үш байланысу сайты бар. ΔG мөлшері -114,6 кДж/моль-дан -129,5 кДж/моль дейін өзгеріп отырды. Алынған *Camelus ferus* Zinc finger тұқымдасы транскрипциялық факторының гендерінің mRNA-мен miRNA-ң байланысу сайттарының сипаттамасы олардың көпшілігінің биосинтезі miRNA көмегімен реттелуі мүмкін екендігін дәлелдейді.

Түйін сөздер: mRNA, miRNA, транскрипциялық факторлар, *Camelus ferus*.

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С ГЕНАМИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ *CAMELUS FERUS*

Введение

Экспрессия большинства генов эукариот зависит от транскрипционных факторов (TF). Они играют важную роль в регуляции всех ключевых процессов в клетках. Кроме этого экспрессия многих генов регулируется miRNA путем связывания с mRNA. miRNA это класс некодирующих РНК, которые играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов. miRNA участвуют во многих биологических процессах, включая клеточный цикл, апоптоз, дифференцировку, развитие скелетных мышц, иммунные реакции, ответ на стресс и другие [1]. Поскольку синтез белков транскрипционных факторов тоже может регулироваться с помощью miRNA, представляется важным установить какие miRNA и в какой степени могут подавлять синтез транскрипционных факторов. В связи с этим мы выявляли характеристики связывания miRNA с mRNA генов zinc finger (ZNF), наиболее многочисленного семейства транскрипционных факторов в геномах млекопитающих. В качестве объекта исследования выбраны ZNF дикого верблюда, поскольку эти животные отличаются от других млекопитающих удивительной приспособленностью к аномальным условиям среды и многим стрессовым факторам [2].

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности mRNA 157 генов транскрипционных факторов семейства ZNF *Camelus ferus* взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности 2563 hsa-miRNA взяты из базы данных miRBase (<http://mirbase.org>). Мы использовали последовательности miRNA человека, так как последовательности miRNA верблюда еще не выявлены. Поиск сайтов связывания miRNA в mRNA генов-мишеней проводили с помощью программы MirTarget [3]. Эта программа определяет: начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), в белок-кодирующей части (CDS) и в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) mRNA; свободную энергию гибридизации (ΔG , кДж/моль) и схемы взаимодейст-

вия нуклеотидов miRNA с mRNA. Рассчитывали величину $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равна свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отобраны с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида mRNA.

Результаты и их обсуждение

Проводили поиск сайтов связывания 2563 miRNA генома *Homo sapiens* в mRNA 157 генов TF семейства ZNF *Camelus ferus*. Установлено, что только в mRNA 63 генов имеются сайты связывания miRNA с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ равной и более 90%. В 5'UTR расположено 19 сайтов, в CDS – 64 сайта и в 3'UTR локализовано 156 сайтов. В среднем в одной mRNA расположено по четыре сайта связывания miRNA. Однако, характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA разных генов сильно варьируют. Например, miR-466 имеет семь упорядоченно расположенных сайтов связывания в mRNA гена *SP1* и по одному сайту в mRNA еще пяти генов. miR-574-5p, состоящая из 23 нуклеотидов, имеет 10 упорядоченно расположенных сайтов связывания в mRNA гена *ZNF618* и 13 сайтов связывания в mRNA гена *GLI2* с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ равной от 91% до 95%. Эти характеристики взаимодействия miR-574-5p с mRNA генов *ZNF618* и *GLI2* свидетельствуют о сильной зависимости их экспрессии от этой miRNA. Экспрессия гена *IKZF3* наиболее зависима от miRNA. Этот ген кодирует семейство zinc-finger белков (Ikaros, Aiolos и Helios), которые являются гематопоэтическими специфическими транскрипционными факторами, включенными в регуляцию развития лимфоцитов. Продукты этого гена важны для регуляции пролиферации В лимфоцитов и дифференцировки [4]. В mRNA гена *IKZF3* имеются сайты связывания miRNA нескольких семейств.

Наибольшее число сайтов связывания выявлено для уникальных miRNA: miR-1273g-3p, miR-1273g-5p, miR-1273h-5p и miR-1273d,e,f. Уникальные miR-5095, miR-5096 и miR-619-5p имеют упорядоченные сайты связывания с высоким сродством, с величиной $\Delta G/\Delta G_m$, достигающей 100%. В mRNA гена *IKZF3* имеются сайты связывания miR-5585-3p и miR-5684. miR-1285-3p имеет восемь сайтов связывания mRNA гена *IKZF3*. miR-3960 имеет сайты связывания в mRNA семи генов, которые расположены в 5'UTR четырех генов, в CDS двух генов

и в 3'UTR одного гена. miR-1322 имеет по одному сайту связывания в mRNA генов-мишени *GLI1*, *HINFP*, *HIVEP1*, *MTF1*, *SALL4*, *SP1*, *ZNF335* и *ZNF451*, два сайта в *ZNF142*, три сайта в гене *EGR1*. Величина ΔG варьирует от -114,6 кДж/моль до -129,5 кДж/моль. Ген *GLI1* повышенно экспрессируется при сквамозной карциноме легкого (LSCC) и подавление его экспрессии наблюдалось в эксперименте при угнетении онкогенеза [5]. Уникальная miR-619-5p имеет сайты связывания в mRNA пяти генов с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ от 91 до 100%. miR-619-5p имеет полностью комплементарный сайт связывания в mRNA гена *ZNF667*. Транскрипционный фактор *ZNF667* участвует в развитии ишемии миокарда и влияет на апоптоз в культуре H9c2 клеток миокарда [6]. Транскрипционный фактор *ZNF667* кодируется и в геномах *Camelus dromedaries*, *Camelus bactrianus* и *Homo sapiens*.

В таблице 1 приведены данные о действии miRNA на гены транскрипционных факторов, общих для *Camelus ferus* и *Homo sapiens*. В mRNA 32 генов TF *Camelus ferus* предсказаны два сайта связывания в 5'UTR, 38 сайтов в CDS и один сайт в 3'UTR. Величина отношения $\Delta G/\Delta G_m$, характеризующая степень сродства miRNA к mRNA, изменяется от 90 до 100%.

mRNA гена *GLIS1* имеет сайты связывания с miR-3142, miR-4417 и miR-7515. mRNA гена *ZNF423* имеет сайты связывания с miR-143-3p, miR-3155b и miR-4481. То есть, экспрессия генов *GLIS1* и *ZNF423* находится под сильным контролем miRNA. *GLIS1* – белок, выполняющий трансактиваторную и репрессорную функции. Ген *ZNF423* может выполнять множественные функции в передаче сигналов во время развития.

По две miRNA связывают mRNA генов *GLI2*, *HIVEP2*, *MTF1*, *TRERF1* и *WIZ*. Ген *TRERF1* кодирует транскрипционную регуляцию белка, регулирующего ген *CYP11A1* [7]. Ген *WIZ* консервативен у шимпанзе, коровы, собаки, мыши, крысы и цыпленка. Этот ген ответствен за сигнал ядерной локализации из критической области при вело-кардио-фациальном синдроме [8]. Белок, кодируемый *HIVEP2* регулирует транскрипцию, связывая регуляторные области различных клеточных и вирусных генов, которые могут быть вовлечены в рост, развитие и метастаз HIV-EP2 [9]. Белок, кодируемый геном *MECOM* – транскрипционный фактор и онкопротеин, включаемый в гематопоз, апоптоз, развитие, клеточную дифференцировку и пролиферацию [10]. Другие изученные транскрипционные факторы тоже участвуют в регуля-

ции, дифференцировке и апоптозе [11-13]. Ген *ZNF423* участвует в развитии рака молочной железы [14]. *KLF9* – циркадный транскрипционный фактор эпидермиса человека, который

контролирует пролиферацию кератиноцитов [15]. Сверхэкспрессия *ZKSCAN4* в различных клеточных линиях ингибирует транскрипционную активность p53 и p21 [16].

Таблица 1 – Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA транскрипционных факторов *Camelus ferus* семейства ZNF локализованных в CDS, 5'UTR (♦) и 3'UTR (●).

Ген	miRNA	Позиция	$\Delta G/\Delta G_m$	Ген	miRNA	Позиция	$\Delta G/\Delta G_m$
<i>E4F1</i>	miR-6861-3p	1037	92	<i>SP6</i>	miR-7162-3p	882	90
<i>EGR1</i>	miR-4318	454	933	<i>TRERF1</i>	miR-1273f	1661	90
<i>EGR4</i>	miR-6867-3p	182	92	<i>TRERF1</i>	miR-3960	1669	93
<i>GFI1</i>	miR-4481	43	93	<i>WIZ</i>	miR-1260a	182	94
<i>GLI2</i>	miR-665	454	93	<i>WIZ</i>	miR-7155-3p	497	92
<i>GLI2</i>	miR-6763-5p	3650	92	<i>ZFPM1</i>	miR-1306-3p	942	94
<i>GLIS1</i>	miR-3142	1405	91	<i>ZKSCAN4</i>	miR-6828-3p	899	94
<i>GLIS1</i>	miR-4417	426♦	90	<i>ZNF142</i>	miR-6132	3916	90
<i>GLIS1</i>	miR-7515	1922	91	<i>ZNF143</i>	miR-4313	25♦	93
<i>HINFP</i>	miR-877-3p	146	93	<i>ZNF212</i>	miR-3155b	1198	90
<i>HIVEP2</i>	miR-1260b	6763	90	<i>ZNF317</i>	miR-342-3p	1346	90
<i>HIVEP2</i>	miR-23a-3p	2474	90	<i>ZNF335</i>	miR-548av-5p	1366	95
<i>KLF15</i>	miR-4302	538	90	<i>ZNF423</i>	miR-143-3p	2363	90
<i>KLF4</i>	miR-4478	394	91	<i>ZNF423</i>	miR-3155b	2918	92
<i>KLF9</i>	miR-4492	289	94	<i>ZNF423</i>	miR-4481	920	91
<i>MECOM</i>	miR-466	5158●	93	<i>ZNF536</i>	miR-4659b-5p	2161	91
<i>MTF1</i>	miR-378e	3373	90	<i>ZNF652</i>	miR-6892-5p	1946	96
<i>MTF1</i>	miR-4776-5p	1693	91	<i>ZNF667</i>	miR-619-5p	3240	100
<i>OSR2</i>	miR-4436b-3p	851	91	<i>ZNF687</i>	miR-939-3p	2839	90
<i>PLAGL2</i>	miR-4279	203	93	<i>ZNF688</i>	miR-4492	242	90
<i>PRDM10</i>	miR-4516	2861	91	<i>ZSCAN29</i>	miR-146b-3p	613	91

Полученные результаты влияния miRNA на mRNA генов семейства ZNF свидетельствуют, что miRNA могут сильно влиять на экспрессию транскрипционных факторов *Camelus ferus*. В

результате зависимости синтеза ZNF от miRNA в клетках будут существенно изменяться такие ключевые процессы как клеточный цикл, апоптоз, пролиферация, дифференцировка и т.д.

Литература

- 1 Chen P.Y., Meister G. MicroRNA-guided posttranscriptional gene regulation // Biol Chem. – 2005. – Vol. 386. – No.12. – P. 1205-1218.
- 2 Kaczynsky P., Adiya Y., Von Wehrden H., Mijiddorj B., Walzer C., et al. Space and habitat use by wild camels in the Trans-altai Gobi of Southern Mongolia // Biol. Conservation. – 2014. – Vol. 169. – P. 311-318.
- 3 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 10(7). – P. 423-427.
- 4 Zhuang Y., Li D., Fu J., Shi Q., Lu Y., et al. Overexpression of AIOLOS inhibits cell proliferation and suppresses apoptosis in Nalm-6 cells // Oncol Rep. – 2014. – Vol. 31(3). – P. 1183-1190.
- 5 Huang L., Walter V., Hayes D.N., Onaitis M. Hedgehog-Gli signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer // Clin Cancer Res. – 2014. – Vol. 20(6). – P. 1566-1575.

- 6 Wang G., Jiang L., Song J., Zhou SF., Zhang H., et al. Mip1 protects H9c2 myogenic cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through inhibition of the expression of the death receptor Fas // *Int J Mol Sci.* – 2014. – Vol. 15(10). – P. 18206-18220.
- 7 Gizard F., Robillard R., Barbier O., Quatannens B., Faucompré A., et al. TReP-132 controls cell proliferation by regulating the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21WAF1/Cip1 and p27Kip1 // *Mol Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25(11). – P. 4335-4348.
- 8 Funke B., Puech A., Saint-Jore B., Pandita R., Skoultchi A., et al. Isolation and characterization of a human gene containing a nuclear localization signal from the critical region for velo-cardio-facial syndrome on 22q11 // *Genomics.* – 1998. – Vol. 53(2). – P.146-154.
- 9 Nomura N., Zhao M.J., Nagase T., Maekawa T., Ishizaki R., et al. HIV-EP2, a new member of the gene family encoding the human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein. Comparison with HIV-EP1/PRDII-BF1/MBP-1 // *Biol Chem.* – 1991. – Vol. 5. – P. 4.
- 10 Bard-Chapeau E.A., Gunaratne J., Kumar P., Chua B.Q., Muller J., et al. EVI1 oncoprotein interacts with a large and complex network of proteins and integrates signals through protein phosphorylation // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2885-2894.
- 11 Yang H.Y., Kim S.H., Kim S.H., Kim D.J., Kim S.U., et al. The suppression of zfp1-1 accelerates the erythropoietic differentiation of human CD34+ cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 353(4). – P. 978-984.
- 12 Zins K., Pomyje J., Hofer E., Abraham D., Lucas T., et al. Egr-1 upregulates Siva-1 expression and induces cardiac fibroblast apoptosis // *Int J Mol Sci.* – 2014. – Vol. 15(1). – P. 1538-1553.
- 13 Sekimata M., Homma Y. Regulation of Rb gene expression by an MBD2-interacting zinc finger protein MIZF during myogenic differentiation // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – Vol. 325(3). – P. 653-659.
- 14 Kumar R., Selth L.A., Schulz R.B., Tay B.S., Neilsen P.M., et al. Genome-wide mapping of ZNF652 promoter binding sites in breast cancer cells // *Cell Biochem.* – 2011. – Vol. 112(10). – P. 2742-2747.
- 15 Spörl F., Korge S., Jürchott K., Wunderskirchner M., Schellenberg K., et al. Krüppel-like factor 9 is a circadian transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2012. – Vol. 109(27). – P. 903-908.
- 16 Li J., Wang Y., Fan X., Mo X., Wang Z., et al. ZNF307, a novel zinc finger gene suppresses p53 and p21 pathway // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 363(4). – P. 895-900.