

УДК 577.21

А.С. Исабекова, О.А. Берилло, В.А. Хайленко, А.Т. Иващенко

ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ МЕЖГЕННЫХ, ИНТРОННЫХ И ЭКЗОННЫХ miRNA С mRNA ГЕНОВ УЧАСТВУЮЩИХ В ОНКОГЕНЕЗЕ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Исследовано взаимодействие 784 межгенных miRNA, 686 интронных miRNA и 49 экзонных miRNA с mRNA 54 генов участвующих в онкогенезе. Выявлены особенности взаимодействия miRNA с 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA каждого гена. Установлена повышенная способность miRNA связываться с 5'UTR по сравнению с CDS и 3'UTR участками mRNA. mRNA изученных генов значительно отличаются по плотности расположения сайтов взаимодействия и числу связываемых miRNA. Основной вклад в энергию взаимодействия miRNA с mRNA вносят нуклеотиды центрального участка, либо 5'- и 3'-участков miRNA. Полученные данные демонстрируют возможность регуляции с помощью miRNA экспрессии генов участвующих в онкогенезе.

Возрастающий интерес к биологической роли miRNA отражается в быстро увеличивающемся количестве публикаций, посвященных изучению свойств этих уникальных регуляторов экспрессии генов [1]. Ключевой проблемой взаимодействия miRNA с mRNA остается нахождение сайтов связывания этих молекул. Считается, что miRNA взаимодействует с mRNA только в 3'UTR [2], а другие участки mRNA не играют значимой роли в модификации ее трансляции. Однако известны публикации, описывающие связывание miRNA с mRNA в 5'UTR и CDS [3-5]. Выяснение сколько miRNA и в каких сайтах они связываются с mRNA позволит получить объективную картину существующих связей между miRNA и mRNA. Остается не решенной проблема получения достоверных данных о том, на какие гены действует одна miRNA и сколько miRNA действуют на один ген [6]. Точное установление таких взаимодействий будет значительно способствовать разработке методов диагностики и терапии различных заболеваний, в том числе и онкологических.

В связи с этими проблемами в настоящей работе поставлены следующие задачи: а) выявить особенности взаимодействия miRNA с различными участками mRNA; в) установить отличия miRNA по способности связываться с разными mRNA; с) выявить особенности взаимодействия нуклеотидов при образовании комплексов miRNA с mRNA.

Материалы и методы

В качестве материала использованы нуклеотидные последовательности mRNA 54 генов человека (*Homo sapiens* Genome build 37.2.), которые были заимствованы из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Все эти гены участвуют в развитии онкологических заболеваний. Нуклеотидные последовательности межгенных miRNA (ig-miRNA), интронных miRNA (in-miRNA), экзонных miRNA (ex-miRNA) получены из

базы miRBase (<http://www.mirbase.org>). Для поиска miRNA была разработана программа miRNA Finder 2.2 (<http://sites.google.com/site/malaheenee/software/mirna-finder>).

Для расчета величины свободной энергии гибридизации (ΔG) мы использовали программу RNAHybrid 2.1, которая позволяет проводить поиск сайтов гибридизации с учетом сайтов-мишеней 5'-доминантного канонического, 5'-seed-доминантного и 3'-компенсаторного типа. В качестве сравнительного количественного критерия силы связи вычисляли величину $\Delta G/\Delta G_m$ (%), в которой ΔG_m равна энергии связи конкретной miRNA с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Поиск сайтов связывания miRNA проводили по всей нуклеотидной последовательности mRNA. Сайты взаимодействия miRNA с mRNA определяли на основании величины ΔG и ее стандартного отклонения. Сродство ig-miRNA, in-miRNA и ex-miRNA к 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA 54 изученных генов оценивали для каждого из этих участков с достоверностью $p < 0,0005$. Плотность сайтов связывания в 5'UTR, CDS, 3'UTR и всей mRNA рассчитывали как отношение числа сайтов (s) к длине нуклеотидной последовательности (l) этих участков, умноженное на 10^3 (s/l), то есть, в расчете на 1000 нуклеотидов.

Результаты и их обсуждение**Взаимодействие межгенных miRNA с mRNA генов, участвующих в онкогенезе**

В результате изучения связывания 784 межгенных miRNA с mRNA 54 белок-кодирующих генов человека установлено, что 47 mRNA являются мишенями и mRNA семи генов (*ABC11*, *MSH2*, *MSH3*, *MYC*, *PROM1*, *SNAT1*, *TNFSF10*) не имеют сайтов связывания с ig-miRNA при установленных критериях взаимодействия. Только 105 miRNA из 784 ig-miRNA действуют на mRNA 47 генов, которые имеют 156 сайтов связывания ig-miRNA.

На таблице 1 приведены результаты исследования взаимодействия межгенных miRNA с mRNA 47 генов, каждая из которых связывает от одной до нескольких ig-miRNA. Некоторые из этих mRNA связывают шесть и более ig-miRNA. Например, mRNA генов *AXINI*, *CCND1*, *CDH1*, *FLCN*, *MMP2*, *SMAD4* и *SRC* имеют соответственно 6, 6, 7, 7, 7, 6 и 11 сайтов для связывания ig-miRNA, что значительно больше среднего числа сайтов связывания miRNA в расчете на одну mRNA 47 генов и равного 3,3. Из данных, представленных на таблице 1 видно, что все mRNA имеют по одному сайту связывания для одной miRNA. Некоторые miRNA связываются с несколькими mRNA. Например, miR-4472 связывается с mRNA семи генов, а miR-1279 имеет пять mRNA-мишеней.

Между длиной изученных mRNA и числом сайтов связывания ig-miRNA связь отсутствует, т.к. коэффициент корреляции равен -0,061. Плотность сайтов связывания разных miRNA с mRNA изученных генов существенно отличалась. Для mRNA представленных в таблице 1 плотность сайтов изменялась от 0,14 s/l (mRNA *BRS1*) до 3,09 s/l (mRNA *BAD*) и в среднем составляла 0,85 s/l. mRNA гена *BAD* имеет наибольшую плотность сайтов связывания, что предполагает важную роль межгенных miRNA в регуляции экспрессии этого гена.

mRNA изученных генов отличаются по связыванию ig-miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR (таблица 1).

Средняя плотность сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA всех 47 генов составляла 2,60 s/l, 0,59 s/l и 0,63 s/l соответственно. Средняя плотность связывания miRNA в 5'UTR выше чем в CDS в 4,4 раза и в 4,1 раза больше, чем в 3'UTR. Полученные данные свидетельствуют, что miRNA могут связываться с 5'UTR и CDS, а не только с 3'UTR. mRNA генов *CD44*, *GNAS* и *P TEN* связывают каждая по пять ig-miRNA и все только в 5'UTR. mRNA генов *BUB1*, *MTHFR*, *SMAD4* и *SRC* связывают ig-miRNA предпочтительно в 3'UTR. Это свидетельствует о специфическом взаимодействии miRNA с mRNA. mRNA гена *SRC* имеет в CDS и 3'UTR соответственно две и девять сайтов связывания с miRNA (таблица 1). Схемы взаимодействия последовательностей нуклеотидов miRNA с mRNA *SRC* для некоторых сайтов приведены на таблице 2. Среди сайтов связывания имеются три типа взаимодействия miRNA с mRNA гена *SRC* отличающиеся по преимущественному вкладу в энергию взаимодействия участков miRNA: 1) доминирует вклад 5'-участка miRNA (miR-4327, miR-4665-3p); 2) доминирует вклад 3'-участка miRNA (miR-568, miR-427, miR-4466); 3) доминирует вклад центрального участка miRNA (miR-320b, miR-320a, miR-320f, miR-320c, miR-320d, miR-4436a). Следовательно, преимущественный вклад в энергию взаимодействия miRNA с mRNA могут вносить все участки miRNA.

Таблица 1

Характеристики 47 mRNA связывающих межгенные miRNA

| mRNA гена: ig-miRNA (участок mRNA, первая позиция сайта – н., $\Delta G/\Delta G_m$ - %) |
|--|
| <i>ABCC2</i> : miR-1246 (CDS, 4484, 82.4), miR-4455 (CDS, 2725, 83.3). <i>ABCG2</i> : miR-4455 (5'UTR, 416, 88.3), miR-4472 (5'UTR, 82, 81.8). <i>ADAM29</i> : miR-4284 (5'UTR, 23, 84.0). <i>ALCAM</i> : miR-21* (5'UTR, 304, 85.0), miR-1279 (3'UTR, 4300, 88.3), miR-4472 (5'UTR, 478, 80.8). <i>APC-I</i> : miR-302f (CDS, 2287, 99.6), miR-4693-5p (3'UTR, 9172, 89.8). <i>APC-2</i> : miR-302f (CDS, 2179, 99.6), miR-4693-5p (3'UTR, 9064, 89.8). <i>APC-3</i> : miR-302f (CDS, 2474, 99.6), miR-4693-5p (3'UTR, 9359, 89.8). <i>AXINI</i> : miR-324-5p (CDS, 1891, 74.4), miR-365* (CDS, 1210, 81.2), miR-1204 (CDS, 2033, 78.9), miR-1268 (5'UTR, 288, 83.2), miR-1587 (CDS, 2006, 79.4), miR-4307 (CDS, 1072, 85.5). <i>AXIN2</i> : miR-125b-1 (5'UTR, 3, 75.3), miR-324-3p (CDS, 1984, 69.6), miR-339-5p (3'UTR, 2956, 75.5), miR-760 (3'UTR, 3622, 78.1), miR-4488 (CDS, 1765, 86.7). <i>BAD</i> : miR-1538 (5'UTR, 28, 74.0), miR-3180 (CDS, 565, 79.5), miR-4665-5p (CDS, 368, 79.3). <i>BAX</i> : miR-4275 (3'UTR, 703, 86.8). <i>BRAF</i> : miR-1260b (CDS, 76, 84.2), miR-4458 (CDS, 1012, 82.8). <i>BRCA1</i> : miR-3613-5p (CDS, 2861, 80.5). <i>BRCA2</i> : miR-4650-5p (3'UTR, 10770, 84.2), miR-4801 (CDS, 10022, 79.2). <i>BUB1</i> : miR-4727-3p (CDS, 1037, 76.8). <i>CCND1</i> : miR-223 (3'UTR, 2261, 76.0), miR-507 (3'UTR, 2113, 78.1), miR-1260b (3'UTR, 2245, 78.7), miR-3180-5p (3'UTR, 2250, 74.5), miR-4481 (3'UTR, 1892, 84.4), miR-4487 (3'UTR, 2022, 84.1). <i>CD44</i> : miR-1268 (5'UTR, 368, 81.7), miR-4455 (5'UTR, 46, 84.9). <i>CDH1</i> : miR-1285 (3'UTR, 3677, 78.8), miR-1587 (5'UTR, 57, 84.6), miR-4472 (CDS, 1890, 84.7), miR-4481 (5'UTR, 49, 85.6), miR-4488 (CDS, 195, 85.3), miR-4507 (5'UTR, 62, 91.0), miR-4710 (5'UTR, 92, 83.9). <i>CTNBI</i> : miR-4708-5p (3'UTR, 2983, 78.0). <i>DLC1</i> : miR-4307 (CDS, 466, 78.6), miR-4472 (CDS, 3158, 81.6), miR-4736 (CDS, 3515, 83.1). <i>ENG</i> : miR-1587 (5'UTR, 207, 77.6), miR-4327 (5'UTR, 313, 78.6), miR-4456 (CDS, 964, 82.2), miR-4472 (3'UTR, 2761, 84.2). <i>EP300</i> : miR-4481 (CDS, 5992, 83.4), miR-4483 (CDS, 6356, 85.6), miR-4717-3p (CDS, 5548, 76.8). <i>FLCN</i> : miR-125b-1 (5'UTR, 68, 76.9), miR-150* (CDS, 863, 81.9), miR-515-3p (CDS, 1099, 78.4), miR-1285 (3'UTR, 3114, 78.1), miR-1972 (3'UTR, 3374, 89.9), miR-4508 (CDS, 678, 85.2), miR-4727-5p (CDS, 1503, 84.0). <i>FZD7</i> : miR-194* (CDS, 577, 75.3), miR-4516 (CDS, 1785, 82.0). <i>GNAS</i> : miR-1268 (5'UTR, 308, 84.6), miR-1587 (5'UTR, 239, 79.2), miR-4466 (5'UTR, 189, 81.7), miR-4507 (5'UTR, 250, 77.5), miR-4787-5p (5'UTR, 338, 75.2). <i>KIT</i> : miR-544 (CDS, 2796, 77.3), miR-3147 (3'UTR, 4505, 73.3), miR-4776-3p (CDS, 648, 74.0). <i>KLF12</i> : miR-221* (3'UTR, 3462, 79.9), miR-4328 (CDS, 1269, 82.6), miR-4704-3p (3'UTR, 7943, 76.5). <i>KRAS</i> : miR-499a-3p (3'UTR, 1989, 77.9), miR-548ak (3'UTR, 3927, 77.7). <i>MET</i> : miR-4307 (CDS, 2579, 81.3). <i>MLH1</i> : miR-320a (CDS, 2278, 76.5), miR-320c (CDS, 2281, 82.6), miR-2113 (CDS, 1458, 81.0), miR-4795-3p (CDS, 1971, 75.1). <i>MLH3</i> : miR-221 (3'UTR, 6103, 75.4). |

Продолжение таблицы 1

| |
|---|
| miR-378b (3'UTR, 6094, 90.6). MMP2 : miR-154 (CDS, 1231, 80.1), miR-212 (5'UTR, 49, 81.7), miR-1205 (5'UTR, 202, 77.7), miR-3202 (3'UTR, 2607, 76.9), miR-3130-5p (5'UTR, 120, 76.1), miR-4665-3p (5'UTR, 126, 75.9), miR-4665-5p (CDS, 334, 74.7). MMP9 : miR-3186-5p (CDS, 1109, 78.2), miR-4443 (CDS, 442, 82.1), miR-4530 (CDS, 2142, 80.3). MSH6 : miR-141* (CDS, 1718, 76.8), miR-1279 (CDS, 964, 89.4), miR-4527 (CDS, 2813, 76.7), miR-4787-5p (CDS, 249, 77.6). MTHFR : miR-513b (3'UTR, 2466, 75.4), miR-513c (3'UTR, 2466, 77.0), miR-720 (CDS, 1725, 86.4), miR-1260 (3'UTR, 6314, 90.4), miR-4269 (3'UTR, 3651, 81.0), miR-4456 (3'UTR, 3254, 83.6). MUTYH-a : miR-331-5p (CDS, 1252, 77.6). PIK3CA : miR-4787-5p (5'UTR, 11, 79.0). PMS1 : miR-9 (CDS, 2912, 75.6), miR-4464 (CDS, 3170, 80.5), miR-4746-3p (5'UTR, 56, 81.4). PMS2 : miR-1279 (CDS, 1497, 83.0). PTEEN : miR-3187-5p (5'UTR, 1007, 74.9), miR-3195 (5'UTR, 69, 85.9), miR-3676 (5'UTR, 514, 77.8), miR-3677-5p (5'UTR, 802, 75.0), miR-4472 (5'UTR, 495, 82.3). PTPN12 : miR-548m (CDS, 2352, 76.3), miR-1279 (CDS, 927, 86.5). SMAD4 : miR-513a-5p (3'UTR, 6663, 83.9), miR-1268 (3'UTR, 4413, 82.7), miR-1285 (3'UTR, 4290, 77.0), miR-1972 (3'UTR, 4547, 80.4), miR-3195 (5'UTR, 338, 83.0), miR-4645-5p (3'UTR, 5621, 79.7). SRC : miR-302f (3'UTR, 2950, 88.1), miR-320a (3'UTR, 2923, 81.0), miR-320b (3'UTR, 2923, 85.5), miR-320c (3'UTR, 2924, 85.5), miR-320d (3'UTR, 2926, 80.5), miR-466 (3'UTR, 3552, 74.9), miR-568 (3'UTR, 3564, 85.1), miR-4278 (CDS, 679, 82.5), miR-4327 (CDS, 554, 78.2), miR-4436a (3'UTR, 2128, 77.5), miR-4466 (3'UTR, 2501, 80.0). TGFBR2 : miR-30b* (3'UTR, 4583, 75.6), miR-377* (CDS, 1364, 78.2), miR-4472 (5'UTR, 116, 81.6). TP53 : miR-1285 (3'UTR, 2298, 98.7), miR-2392 (3'UTR, 1540, 78.7). VDR : miR-1275 (3'UTR, 2694, 84.3), miR-4298 (CDS, 1092, 75.3), miR-4507 (3'UTR, 3066, 81.6), miR-4650-5p (CDS, 881, 78.9). ZEB1 : miR-1279 (CDS, 1131, 89.4), miR-3613-5p (CDS, 3405, 78.9), miR-4307 (CDS, 3328, 79.9), miR-4732-3p (CDS, 3326, 76.3), miR-4455 (CDS, 3891, 84.9), miR-4465 (CDS, 1769, 80.0), miR-4704-3p (CDS, 3158, 77.5). |
|---|

Таблица 2

Характеристики взаимодействия некоторых ig-miRNA с mRNA гена SRC

| | |
|--|--|
| mRNA 5' A G G 3' UGUGUGUGCAU UGUGCGU ACACAUAUGUA AUAUGUA miR-568 3' C A 5' 3'UTR,3564 $\Delta G = -26,2 \Delta G/\Delta G_m = 85,1$ | mRNA 5' A G C 3' GAGGGCGGGCCC CUGG UCCCCGUUUGGG GAUC miR-4278 3' G G 5' CDS,679 $\Delta G = -32,9 \Delta G/\Delta G_m = 82,5$ |
| mRNA 5' G A A 3' CAG CCCCCA GCAAGCC GUC GGGGGU CGUUCGG miR-4327 3' G A A 5' CDS,554 $\Delta G = -35,8 \Delta G/\Delta G_m = 78,2$ | mRNA 5' C G G 3' UGCCC CUCAGCCCAGCU ACGGG GAGUUGGGUCGA miR-320b 3' A A AAA 5' 3'UTR,2923 $\Delta G = -39,6 \Delta G/\Delta G_m = 85,5$ |
| Примечание. На таблицах 2 и 4 локализация 5'-участка сайтов связывания в mRNA указана в нуклеотидах; энергия взаимодействия (ΔG) - в kcal/mol; величина $\Delta G/\Delta G_m$ - в %. | |

Из данных приведенных на таблице 2 видно, что miR-568 и miR-4278 связываются большей своей частью, начиная с 3'-участка miRNA. Сайт взаимодействия с miR-4327 является примером связывания с большим вкладом в энергию взаимодействия 5'-участка miRNA. Сайт связывания miR-320b демонстрирует наибольший вклад в энергию взаимодействия центральной части.

Взаимодействие интронных miRNA с mRNA генов, участвующих в онкогенезе

Было изучено связывание 686 интронных miRNA (in-miRNA) с mRNA 54 белок-кодирующих генов человека. Из mRNA 54 генов мишенями являются mRNA 45 генов и mRNA семи генов (*ABCBI*, *ABCG2*, *ADAM29*, *BAX*, *MLH1*, *MLH3*, *PROM1*, *TNFSF10*) не имеют сайтов связывания с in-miRNA при установленных критериях взаимодействия (таблица 3). Только 88 из 686 in-miRNA действуют на mRNA 45 генов. mRNA изученных генов значительно отличаются по числу связывания с in-miRNA (таблица 3). Например, mRNA генов *EP300*, *FLCN*, *MTHFR*, *PTEEN* и *SMAD4* связывают соответственно 6, 7, 7, 6 и 8 in-miRNA, что значительно больше

среднего числа miRNA связывающихся с одной mRNA и равного 2,0.

Из 88 miRNA только miR-574-5p имеет два сайта связывания с mRNA гена *EP300*. Между длиной изученных mRNA и числом сайтов связывания miRNA нет достоверной связи, т.к. коэффициент корреляции равен 0,023. Для mRNA представленных в таблице 3 плотность сайтов изменялась от 0,09 s/l (mRNA *APC3*) до 4,12 s/l (mRNA *BAD*) и в среднем составляла 0,76 s/l. mRNA *BAD* имеет наибольшую плотность сайтов связывания, что свидетельствует о большой роли in-miRNA в регуляции экспрессии этого гена.

mRNA разных генов отличаются по связыванию miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR. miRNA генов *PTEEN* и *GNAS* имеют соответственно шесть и четыре сайта связывания только в 5'UTR. miRNA гена *SMAD4* имеет восемь сайтов связывания только в 3'UTR. Средняя плотность сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA всех генов составляла 1,91 s/l, 0,50 s/l и 0,64 s/l соответственно. То есть, средняя плотность связывания miRNA в 5'UTR в 3,8 раза выше, чем в CDS и в 3,0 раза выше, чем в 3'UTR. Приведенные данные свидетельствуют, что

miRNA могут связываться с 5'UTR и CDS, а не только с 3'UTR mRNA.

mRNA генов имели в 5'UTR, CDS и 3'UTR сайты связывания с miRNA (таблица 3). Схемы взаимодействия последовательностей нуклеотидов некоторых miRNA с mRNA онкогенов приведены на таблице 4. Имеются три типа взаимодействия miRNA с mRNA в сайтах связывания, отличающиеся по

преимущественному вкладу в энергию взаимодействия частей miRNA: 1) доминирует вклад 3'-участка miRNA (miR-533, miR-1273f), 2) доминирует вклад центрального участка miRNA (miR-593, miR-3115), 3) доминирует вклад 5'-участка miRNA (miR-4799-3p, miR-1913). Следовательно, преимущественный вклад в энергию взаимодействия miRNA с mRNA могут вносить все участки miRNA

Таблица 3

Характеристики 45 mRNA связывающих in-miRNA

| mRNA гена: in-miRNA (участок mRNA, первая позиция сайта - н., ΔG/ΔG _m - %) | |
|---|--|
| ABCC2: miR-618 (CDS, 3188, 75.6). ALCAM: miR-590-3p (CDS, 2177, 76.4), miR-885-3p (5'UTR, 70, 77.0), miR-4677-5p (CDS, 1732, 77.3). APC-I: miR-576-5p (CDS, 1871, 79.5), miR-942 (5'UTR, 80, 80.5). APC-2 miR-576-5p (CDS, 1763, 79.5). APC-3: miR-576-5p (CDS, 2057, 79.5). AXINI: miR-1203 (CDS, 1749, 77), miR-1268b (5'UTR, 288, 77.4), miR-3684 (3'UTR, 3288, 78.6), miR-4524* (CDS, 1352, 76.3). AXIN2: miR-339-5p (3'UTR, 2956, 75.5), miR-3181 (5'UTR, 133, 79.8). BAD: miR-211 (CDS, 316, 81.1), miR-609 (CDS, 333, 77.8), miR-1910 (5'UTR, 32, 76.0), miR-1915 (3'UTR, 903, 79). BRAF: miR-149 (CDS, 82, 74.4). BRCAl: miR-3121-5p (CDS, 2047, 75.3), miR-5095 (3'UTR, 6401, 79.2). BRCa2: miR-224 (5'UTR, 31, 78.0), miR-5095 (3'UTR, 10731, 76.9). BUB1: miR-500a* (CDS, 2495, 77.0), miR-502-3p (CDS, 2496, 76.0), miR-4287 (CDS, 2047, 80.6), miR-4799-3p (CDS, 455, 81.2). CCND1: miR-574-5p (3'UTR, 2594, 79.0), miR-877* (3'UTR, 2971, 81.3), miR-1236 (3'UTR, 2960, 77.0). CD44: miR-766 (3'UTR, 1963, 77.5), miR-1268b (5'UTR, 367, 81.5). CDHI: miR-548ah (3'UTR, 4585, 78.6), miR-1273 (3'UTR, 3672, 82.4), miR-1285 (3'UTR, 3677, 78.8). CTNNB1: miR-1236 (5'UTR, 99, 76.5). DLCl: miR-3691-5p (CDS, 3084, 75.4), miR-4506 (CDS, 3711, 79.2), miR-4766-3p (3'UTR, 7006, 76.7). ENG: miR-1273g (CDS, 459, 82.6), miR-2467-5p (CDS, 1813, 78.8), miR-3621 (CDS, 1411, 77.2), miR-4436b-3p (5'UTR, 234, 75.5). EP300: miR-511 (CDS, 927, 76.0), miR-574-5p (3'UTR, 8579, 82.8; 8557, 79.0), miR-4436b-3p (CDS, 2779, 82.4), miR-4439 (CDS, 2814, 76.0), miR-4668-3p (CDS, 1082, 76.0). FLCN: miR-553 (3'UTR, 3277, 84.4), miR-640 (CDS, 1558, 76.8), miR-1272 (CDS, 1799, 77.9), miR-1273d (3'UTR, 3166, 77.2), miR-1273f (3'UTR, 3165, 83.4), miR-1285 (3'UTR, 3114, 78.1), miR-3646 (3'UTR, 2373, 75.0). FZD7: let-7g* (3'UTR, 2152, 84.1), miR-502-5p (CDS, 648, 78.5), miR-598 (3'UTR, 2016, 75.8). GNAS: miR-885-3p (5'UTR, 180, 77.4), miR-1268b (5'UTR, 306, 85.1), miR-3178 (5'UTR, 325, 88.6), miR-4651 (5'UTR, 249, 81.4). KIT: miR-4748 (CDS, 1626, 76.6). KLF12: miR-574-5p (3'UTR, 6769, 75.0), miR-4799-3p (3'UTR, 5734, 78.0). KRAS: miR-1913 (5'UTR, 15, 76.0). MET: miR-23b* (CDS, 1149, 79.4), miR-553 (3'UTR, 4939, 76.4), miR-1273f (3'UTR, 4993, 91.1), miR-3657 (CDS, 2496, 80.0). MMP2: miR-502-5p (CDS, 1945, 77.0), miR-1913 (5'UTR, 117, 81.9), miR-3130-5p (5'UTR, 120, 76.0), miR-3202 (3'UTR, 2607, 76.9). MMP9: miR-1236 (CDS, 1870, 76.5). MSH2: miR-4668-3p (CDS, 1327, 77.1). MSH3: miR-5096 (3'UTR, 4208, 76.4). MSH6: miR-4296 (CDS, 310, 85.0). MTHFR: miR-593 (CDS, 1726, 87.0), miR-1289 (3'UTR, 4361, 83.3), miR-1976 (3'UTR, 5083, 81.0), miR-4296 (3'UTR, 4685, 82.8), miR-4540 (3'UTR, 3122, 78.1), miR-5095 (3'UTR, 6848, 79.2), miR-5096 (3'UTR, 6928, 79.2). MUTYH-a: miR-608 (CDS, 962, 72.6), miR-1273f (CDS, 442, 78.1), miR-3115 (CDS, 1016, 80.5). MYC: miR-1268b (5'UTR, 24, 77.0), miR-3196 (5'UTR, 36, 80.6), miR-4258 (CDS, 827, 83.0), miR-4726-5p (CDS, 764, 75.8). PMS1: miR-9 (CDS, 2912, 75.6), miR-5481 (5'UTR, 63, 75.6), miR-3620 (5'UTR, 415, 78.0). PMS2: miR-3682-5p (CDS, 726, 77.5). PTEEN: miR-346 (5'UTR, 95, 76.9), miR-511 (5'UTR, 904, 83.2), miR-593 (5'UTR, 739, 87.9), miR-885-3p (5'UTR, 791, 76.0), miR-1249 (5'UTR, 513, 75.7), miR-1913 (5'UTR, 82, 88.3). PTPN12: miR-548j (CDS, 1100, 80.3), miR-1238 (5'UTR, 38, 79.6). SMAD4: miR-566 (3'UTR, 4401, 78.1), miR-574-5p (3'UTR, 7822, 85.3; 7734, 79.7), miR-644 (3'UTR, 5307, 78.4), miR-1273 (3'UTR, 4290, 78.4), miR-1273f (3'UTR, 4340, 82.4), miR-1285 (3'UTR, 4290, 77.0), miR-4799-3p (3'UTR, 8560, 77.8). SNAIL: miR-1224-5p (CDS, 216, 80.9), miR-1228* (3'UTR, 903, 77.8). SRC: miR-320b (3'UTR, 2923, 85.5), miR-3162-3p (3'UTR, 4019, 76.8), miR-4748 (3'UTR, 3474, 81.1). TGFBR: miR-511 (3'UTR, 4104, 80.8; CDS, 1307, 76.5). TP53: miR-1273 (3'UTR, 2298, 73), miR-1273g (3'UTR, 2344, 81.8), miR-3192 (3'UTR, 2511, 77). VDR: miR-2278 (CDS, 1669, 77.0), miR-4312 (3'UTR, 2081, 78.7), miR-4646-3p (3'UTR, 2899, 80.5), miR-5096 (3'UTR, 3894, 84.3). ZEB1: miR-548ah (CDS, 741, 79.2), miR-574-5p (3'UTR, 3863, 79.0). | |

Таблица 4

Характеристики взаимодействия in-miRNA с mRNA некоторых онкогенов

| | |
|--|--|
| mRNA FLCN 5' A G 3' GAGACGGGGUUUACCGU UUUUGUUUUAGAGUGGCA miR-553 3' AAA 5' | mRNA MET 5' U C C 3' CACUGCAACCUCCA CUCC GUGACGUUGGAGGU GAGG miR-1273f 3' A 5' |
| 3' UTR, 3277 ΔG = -27,5 ΔG/ΔG _m = 84,4 | 3' UTR, 4993 ΔG = -37,9 ΔG/ΔG _m = 91,0 |
| mRNA MTHFR 5' U U 3' GGGGCCCCAGCGGGGGC CUUUGGGGUCGUCUCUG miR-593 3' U U 5' | mRNA MUTYH 5' G G 3' CAGCUGGUGGACCCA GUUGAUCAUUUGGGU miR-3115 3' UG AUA 5' |
| CDS, 1726 ΔG = -36,0 ΔG/ΔG _m = 87,0 | CDS, 1016 ΔG = -28,9 ΔG/ΔG _m = 80,5 |
| mRNA BUB1 5' C G 3' UGCAGCAUGCCAGU ACGUCGUACGGUCA miR-4799-3p 3' AUAUAUUU 5' | mRNA PTEEN 5' G C C 3' G GCGGCGGCGGAGGGGGCGGG C CGUCGUCGCCUCCCGGUCU miR-1913 3' A 5' |
| CDS, 455 ΔG = -32,9 ΔG/ΔG _m = 81,2 | 5' UTR, 82 ΔG = -50,7 ΔG/ΔG _m = 88,3 |

Взаимодействие экзонных miRNA с mRNA генов, участвующих в онкогенезе

В результате изучения связывания экзонных miRNA (ex-miRNA) с mRNA

белок-кодирующих генов человека установлено, что из mRNA этих генов мишенями для ex-miRNA являются mRNA 15

генов (таблица 5). Только 11 miRNA из 49 ex-miRNA действуют на mRNA 14 генов.

Таблица 5

Характеристики связывания 14 mRNA с экзонными miRNA

| mRNA гена: ex-miRNA (mRNA участок, первая позиция сайта - н., $\Delta G/\Delta G_m$ - %) |
|---|
| <i>ABCBI</i> : miR-4724-3p (CDS, 1725, 78.5). <i>AXINI</i> : miR-1306 (5'UTR, 43, 88.6; CDS, 1330, 89.4), miR-4315 (5'UTR, 12, 81.1). <i>AXIN2</i> : miR-1306 (CDS, 1167, 86.5). <i>CCND1</i> : miR-4687-5p (3'UTR, 1349, 80.0). <i>CD44</i> : miR-4775 (3'UTR, 3641, 80.7). <i>ENG</i> : miR-3652 (CDS, 1384, 82.9). <i>EP300</i> : miR-4800-3p (CDS, 2196, 79.1). <i>KIT</i> : miR-4709-5p (CDS, 656, 78.7). <i>MMP2</i> : miR-935 (5'UTR, 116, 74.8), miR-1306 (5'UTR, 183, 85.5). <i>MSH3</i> : miR-3652 (CDS, 282, 81.2). <i>MTHFR</i> : miR-4751 (3'UTR, 5471, 73.5). <i>PMS1</i> : miR-4687-5p (5'UTR, 415, 75.7). <i>PTPN12</i> : miR-4800-3p (5'UTR, 38, 80.5). <i>SNAIL</i> : miR-4687-3p (3'UTR, 907, 77.1). |

mRNA изученных генов-мишеней отличаются по числу связывания с ex-miRNA. Например, mRNA генов *AXINI*, *MMP2* связывают по две ex-miRNA. miR-1306 имеет четыре сайта связывания в трех mRNA, а miR-3652, miR-4687-5p, miR-4800-3p действуют каждая на два гена (таблица 5).

Между длиной изученных mRNA и числом сайтов связывания miRNA отсутствует связь, т.к. коэффициент корреляции равен -0,46 ($p < 0,09$). Для mRNA представленных в таблице 5 плотность сайтов изменялась от 0,11 s/l (mRNA гена *EP300*) до 0,82 s/l (mRNA гена *AXINI*) и в среднем составляла 0,40 s/l. Высокая плотность сайтов связывания у mRNA гена *AXINI* свидетельствует о важной роли miRNA в регуляции экспрессии этого гена.

mRNA разных генов отличаются по связыванию ex-miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR. Средняя плотность сайтов связывания ex-miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA всех генов составляла 1,75 s/l, 0,17 s/l и 0,32 s/l, соответственно. То есть, средняя плотность связывания ex-miRNA в 5'UTR выше, чем в CDS в 10,3 раза и в 5,5 раза выше, чем в 3'UTR. mRNA генов *AXINI* и *MMP2* имели по два сайта связывания ex-miRNA в 5'UTR. Несмотря на небольшое число генов-мишеней для ex-miRNA, приведенные данные показывают, что ex-miRNA могут связываться с 5'UTR и CDS, а не только с 3'UTR mRNA.

Количество miRNA, выявленных в организме человека, постоянно растет и к настоящему времени насчитывается более 1500 miRNA. Установление генов-мишеней для miRNA зависит от эффективности их предсказания с помощью вычислительных методов и по предварительным данным, экспрессия более половины генов человека может регулироваться с помощью miRNA [2]. Результаты проведенных нами исследований показывают, что mRNA большинства из 54 генов являются мишенью для трех типов miRNA: ig-miRNA, in-miRNA и ex-miRNA (таблицы 1, 3, 5). Значительная часть miRNA имеет больше, чем

по одному сайту связывания с mRNA. На основании этих данных можно предположить, что экспрессия значительной части генов человека подвержена регуляции посредством miRNA [7]. Показано, что синтез многих miRNA имеет тканевую специфичность и их концентрация в клетках может быть значительно ниже необходимой для подавления экспрессии mRNA генов-мишеней [8]. В таком случае miRNA, даже полностью комплементарная к mRNA, не будет оказывать существенного эффекта на синтез белка. Интронные miRNA составляют около 45% от общего числа miRNA и их синтез прямо зависит от транскрипции соответствующего хозяйского гена. В определенных условиях синтез miRNA может увеличиваться в сотни раз и тогда эти miRNA могут значительно модифицировать экспрессию генов-мишеней [9].

Из полученных результатов следует, что mRNA некоторых генов являются мишенью как для ig-miRNA, так и для in-miRNA (таблицы 1, 3 и 5). Такими генами являются *FLCN*, *MTHFR*, *SMAD4* и *SRC* mRNA которых имеют по 14 сайтов связывания с miRNA. Средняя длина mRNA этих генов равна 5926 н. и средняя плотность сайтов связывания miRNA равна 2,4 s/l. То есть экспрессия этих генов находится под сильным контролем ig-miRNA и in-miRNA. Наибольшую плотность сайтов связывания miRNA имеет mRNA гена *BAD*, которая содержит 7 сайтов связывания при длине 970 н. (таблицы 1, 3). Средняя плотность сайтов связывания miRNA с mRNA гена *BAD* равна 7,2 s/l. Продукт этого гена взаимодействует с белком BCL2 и участвует в регуляции апоптоза [10]. Некоторые miRNA действуют на mRNA только одного гена, что можно использовать в молекулярной медицине для селективной модификации экспрессии соответствующих генов-мишеней.

1. Liu J., Jennings S.F., Tong W., Hong H. Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development. *J. Biomedical Science and Engineering*, 2011, Vol.4, P.666-676.

2. Grimson A., Fahr K.K., Johnston W.K., Garrett-Engele P., Lim L.P., Bartel D.P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell.*, 2007. Vol.27. P. 91-105

3. Lee I., Ajay S., Yook J. et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Research*, 2009, Vol.19, P.1175-1183.

4. Tay Y., Zhang J., Thompson A., Lim B. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, Vol.455, P.1124-1128.

5. Tsai N.-P. et al., MicroRNA mir-346 targets the 5'UTR of RIP140 mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J.*, 2009, Vol.424, P.411-418.

6. Shirdel E.A., Xie W., Mak T.W., Jurisica I. NAViGaTing the micronome—using multiple microRNA prediction databases to identify signaling pathway-associated microRNAs. *PLoS ONE*, 2011, Vol.6 (2): e17429. doi:10.1371/journal.pone.0017429.

7. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, Vol.120, P.15–20.

8. Kowarsch A., Marr C., Schmid D., Ruepp A., Theis F.J. Tissue-specific target analysis of disease-associated microRNAs in human signaling pathways. *PLoS ONE*, 2010, Vol.5(6): e11154. doi:10.1371/journal.pone.0011154.

9. Patel N., Sauter E.R. Body fluid micro(mi)RNAs as biomarkers for human cancer. *J.Nucl.Acids Investigation*, 2011, Vol.2, e1.

10. Sakamaki J., Daitoku H., Ueno K., Yamagata K., Fukamizu A. Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol.108(15), P.6085-6090.

784 генаралық, 686 интронды miRNA мен 49 экзонды miRNA-ның 54 онкогенезде қатысатын генмен байланысуы зерттелді. miRNA-ның әрбір геннің mRNA-ның 5'UTR, CDS және 3'UTR-мен байланысу ерекшеліктері анықталды. miRNA-лар mRNA-ның 5'UTR-мен, CDS пен 3'UTR салыстырғанда байланысу қабілеті жоғарырақ екені көрсетілді. Зерттелген гендердің mRNA сайттардың орналасу тығыздығы мен байланысатын miRNA саны бойынша бір-бірінен өзгешеленеді. miRNA мен mRNA байланысындағы энергиясын құрауда miRNA-ның орталық бөлігі немесе 5'- мен 3'-бөлігі негізгі үлес алуы мүмкін. Алынған нәтижелер онкогенезге қатысатын гендердің экспрессиясының miRNA-мен реттелу мүмкіндіктерін көрсетеді.

Interaction of 784 intergenic miRNAs, 686 intronic and 49 exonic miRNAs with mRNA of 54 genes involving in oncogenesis were investigated. Interaction features of miRNAs with 5'UTR, CDS, 3'UTR of mRNA of each gene were revealed. High ability of miRNA to bind to 5'UTR in comparison with CDS and 3'UTR of mRNA. mRNA of studied genes are significantly different according to the number of binding miRNAs and location density of sites. Nucleotide of central part, 5'- or 3'-part of mRNA may contribute to main role in interaction energy with miRNA. Obtained results demonstrate ability of miRNA in gene expression regulation of genes involving in oncogenesis.

Д. Қазыкен¹, Р.І. Берсімбай¹, Д.Д. Сарбасов²

mTOR СИГНАЛ ЖОЛЫНЫҢ ЖОҒАРҒЫ АҒЫНДЫҚ РЕТТЕУШІЛЕРІ

¹Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан,

²Молекулалық және жасушалық онкология департаменті,

Техас университеті М.Д. Андерсон қатерлі ісік орталығы, Техас, АҚШ)

mTOR – фосфатидилинозитолкиназаға қатысты киназалар (PIKK) тобына жататын ақуыз киназасы. mTOR екі түрлі бір-біріне ұқсамайтын комплексте болады: mTORC1 және mTORC2. Олардың ақуыздық құрамы және құрылымының өзгеше болуына байланысты, mTOR комплекстерінің рапамицинге сезімталдығы, жинақтайтын жоғары ағындақ сигналдары, реттейтін субстраттары және контрольдайтын биологиялық процестері де бір-біріне ұқсамайды. Жасушаның өсуі және көбею өсу факторлары, қоректік заттар, гормондар, жасушаның іші-сыртындағы энергия статусы, стрестік жағдайлар қатарлы жасушаны қоршаған ортаның әсер етуші факторларына сигнал жүйелерінің ұйымдасқан жауабы ретінде реттеледі, mTOR сигналы жолы осы көбею, өсу, дифференциация және жасушаның тіршілігін сақтауы қатарлы маңызды жасушалық процестердің ішіндегі әртүрлі бағыттардың негізгі реттеуші сигнал жолдарының бірі болып табылады. TOR ақуыз киназасы осы сигнал жүйелерінің ішінде эволюциялық жақсы сақталған реттеуші. mTOR-дың PI3K/PTEN/Akt/TSC сигнал жолына байланыстылығы себепті әртүрлі қатерлі ісік ауруларымен қатар басқа да аурулардың негізгі тудырушысы болады.

Жануарлардағы TOR, mTOR – атипикалы церин/треониндік протеинкиназа, ол болжамалы молекулалық массасы 290 кДа фосфатидилинозитолкиназаға қатысты киназалар (PIKK) тобына жатады [1, 2]. Жасушадағы mTOR-дың сигналдау функциялары кем дегенде екі түрлі mTOR ақуыз комплексі арқылы өтеді: mTORC1 және mTORC2 [3]. mTORC1 комплексі гомодимер, оның mTOR киназасынан басқа төрт компоненті

бар: раптор (raptor, regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (сүтқоректілер үшін леталды Sec13 protein 8, және GβL деген атпен де белгілі), PRAS40 (пролинге бай АКТ субстрат) және Deptor (DEP-домені бар mTOR-мен әрекеттесетін ақуыз) [4, 5]. Кең көлемді жоғарғы ағындық сигналдарға жауап ретінде mTORC1 комплексі макромолекулалар синтезі мен қоректік заттардың сақталуы секілді анаболикалы процестер және автофагия секілді