

- 1 Hassan S., M. Buchanan, K. Jahan et al. CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model // International Journal of Cancer.- 12 nov.- 2010.
- 2 Chong K, Subramanian A, Sharma A, Mokbel K, et al. Measuring IGF-1, ER- α and EGFR Expression Can Predict Tamoxifen-resistance in ER-positive // Breast Cancer.Anticancer Res.- 2011.- №31.- P. 23-32;
- 3 Liu, J. He, Zh. Yuan et al. EGFR expression correlates with decreased disease-free survival in triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray // Med Oncol. January.- 2011.
- 4 Zhang H, Jin F. HER-2 Expression Correlates with Survivin in Primary Invasive Ductal Breast Cancers. // Asian Pac J Cancer Prev. 201. - №11(5).- P.1201
- 5 Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т. Свойства генов, участвующих в развитии рака молочной железы. // Вестник КазНУ им.аль-Фараби. Серия биол. - 2010.- №3(45). - С.33-39.
- 6 Тарантул В.З Геном человека: Энциклопедия, написанная четырьмя буквами. - М.: Языки славянской культуры, 2003. -С. 396.

Сүт безі ісігінің дамуына қатысатын алты ген зерттелген, бұл жұмыста осы онкогендердің жеке экзондарға және экзондардың топтарға праймерлері табылды.

It is analyzed six genes, participating in development of a breast cancer, for this oncogenes a number primers for separate exons and groups exons in work is offered.

УДК 577.21

А.А. Бари, В.А. Хайленко, А.Т. Иващенко

ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ miR414 С mRNA ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 4 *Arabidopsis thaliana*

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби)

Выявлены характеристики связывания miR414 с mRNA 236 генов хромосомы 4 Arabidopsis thaliana. Установлены существенные отличия mRNA изученных генов по числу сайтов связывания и энергии взаимодействия с miR414.

МикроРНК (miRNA) растений изучены в меньшей степени, чем miRNA животных, однако интерес к ним постоянно растет и благодаря этому получают все больше новых данных о их роли в биологических процессах растений [1-5]. Показано участие miRNA в регуляции развития, роста, дифференцировки, апоптоза [6-10]. Экспрессия многих miRNA изменяется при реакции растений на абиотические и биотические виды стресса: засуха, температура, тяжелые металлы, токсины, патогены и т.д. [11-20].

В большинстве публикаций по изучению miRNA выявлялись корреляции между увеличением или уменьшением их концентрации при различных воздействиях на растения, либо в связи с процессами онтогенеза. Такая информация важна, однако еще мало изучено действие miRNA на конкретные mRNA генов-мишеней. Учитывая, что влияние miRNA на различные процессы осуществляется посредством действия на mRNA, то очевидна необходимость выявления генов-мишеней каждой miRNA. Эта задача является сложной, поскольку поиск в лаборатории генов-мишеней для miRNA требует значительного времени и больших материальных затрат. Сложность задачи заключается и в том, что для одной miRNA, как правило, имеется несколько или даже десятки генов-мишеней, а для одного гена несколько miRNA, связывающихся с соответствующей mRNA.

С помощью методов биоинформатики созданы базы данных о предполагаемых miRNA и их генах-мишенях (miRBase <http://www.mirbase.org>). Однако, даже в полностью секвенированных и аннотированных геномах *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* выявляют новые miRNA и новые белок-кодирующие гены. Кроме этого, известные методы предсказания генов-мишеней для miRNA имеют определенные недостатки и требуется создание более совершенных компьютерных программ и методических подходов для выявления мишеней для miRNA.

К началу выполнения настоящей работы было известно более 300 генов miRNA *A. thaliana*. Среди этих miRNA для miR414 было известно наибольшее число генов-мишеней равное 100, что послужило причиной с помощью новых методических подходов дать характеристику сайтов взаимодействия miR414 с mRNA соответствующих генов. В работе проведен поиск новых мишеней для miR414 и установлены характеристики взаимодействия этой miRNA с mRNA генов *A. thaliana*.

Материалы и методы

В качестве материала использованы нуклеотидные последовательности mRNA 4122 генов хромосомы 4 *A. thaliana*, которые были взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидная

последовательность miR414 получена из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org>). Известно несколько программ (RNAhybrid <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mzhybrid>, PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>), TargetScanS <http://genes.mit.edu/targetscan/>), DIANA-microT (http://diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi), miRanda (<http://www.microrna.org/>), rna22 (<http://cbsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) и др.), которые позволяют предсказывать mRNA-мишени. Программы TargetScanS, TargetScan, miRanda основаны на использовании метода seed-комплементарности, а программы DIANA-microT и RNAhybrid находят сайты гибридизации miRNA с mRNA с помощью термодинамических оценок. Программа RNAhybrid позволяет проводить поиск сайтов гибридизации нескольких типов: 5'-доминантного канонического, 5' seed-доминантного и 3'-компенсаторного типа. Для расчета величины свободной энергии гибридизации (ΔG) мы использовали программу RNAHybrid 2.1. Поиск сайтов связывания miRNA 4122 изученных генов проводили по всей нуклеотидной последовательности mRNA. Сайты взаимодействия miRNA с mRNA определяли на основании величины ΔG и ее стандартного отклонения. Сродство miRNA к mRNA оценивали для каждого сайта с достоверностью $p < 0,002$. Еще одним критерием отбора генов-мишеней служила величина ΔG составляющая не менее 70% от 40,0 ккал/моль - величины ΔG_m для взаимодействия miR414 с полностью комплементарной ей последовательностью нуклеотидов.

Результаты и их обсуждение

В хромосоме 4 *A. thaliana* нами обнаружено 236 генов-мишеней для miR414. Среди этих генов имеются 87 из ранее предсказанных 100 генов-мишеней для miR414. Тринадцать ранее предсказанных генов не вошли в число 236 генов, поскольку mRNA 9 генов имели свободную энергию взаимодействия с miR414 менее 70% от ΔG_m и соответственно уровень достоверности был ниже: от $p < 0,003$ до $p < 0,005$, а остальные 4 гена (AT4G04400, AT4G04635, AT4G09370, AT4G28960) являются псевдо-генами. Некоторые mRNA новых генов-мишеней имели более одного сайта взаимодействия с miR414. В таблице 1 приведены характеристики связывания mir414 в нескольких сайтах mRNA генов хромосомы 4 *A. thaliana*.

Таблица 1

Характеристики связывания mir414 в нескольких сайтах mRNA генов хромосомы 4 *A. thaliana*

Ген	Сайт, н.	Участок mRNA	ΔG , %	$p <$	Функция гена
AT4G12610	1023	CDS	84,7	0,0002	transcription initiation factor IIF subunit alpha
	923	CDS	73,5	0,0008	
	1632	CDS	73,5	0,0008	
	1524	CDS	72,0	0,0010	
AT4G16960	3542	3'UTR	88,3	0,0001	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
	3684	3'UTR	85,5	0,0002	
	3647	3'UTR	81,9	0,0003	
	3723	3'UTR	73,8	0,0008	
AT4G26110	2263	3'UTR	100	0,0000	DNA repair - nucleosome assembly protein 1-like 1
	2200	3'UTR	74,3	0,0007	
	2223	3'UTR	73,5	0,0008	
AT4G26600	370	CDS	90,6	0,0001	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
	343	CDS	87,5	0,0001	
	3441	3'UTR	72,5	0,0010	
AT4G31160	6778	3'UTR	75,1	0,0006	DDB1- and CUL4-associated factor-1
	6996	3'UTR	73,5	0,0008	
	6760	3'UTR	71,0	0,0012	
AT4G31420	1215	CDS	85,0	0,0002	Zinc finger protein 622
	532	CDS	83,0	0,0002	
	655	CDS	74,5	0,0007	

Эти данные показывают, что почти половина сайтов связывания mir414 могут находиться в белок-кодирующей части mRNA. Энергия взаимодействия в пяти из этих сайтов выше 80% от ΔG_m , что свидетельствует о высокой вероятности связывания mir414 с mRNA. Наличие нескольких сайтов связывания mir414 в mRNA приведет к еще большей вероятности остановки процесса ее трансляции, чем в случае наличия только одного сайта.

В таблице 2 приведены данные о характеристиках связывания miR414 в двух сайтах mRNA генов хромосомы 4 *A. thaliana*. В mRNA18 генов-мишеней число сайтов взаимодействия с miR414 в 2,5 раза больше в CDS, чем в 3'UTR. Кроме этого один сайт выявлен в 5'UTR mRNA гена AT4G16830. Эти данные тоже убедительно свидетельствуют о возможности подавления трансляции молекулами miRNA в сайтах белок-кодирующей области mRNA.

Таблица 2

Характеристики связывания miR414 в двух сайтах mRNA генов хромосомы 4 *A. thaliana*

Ген	Сайт, н.	Участок к mRNA	ΔG , %	p<	Функция гена
AT4G02070	605	CDS	81,4	0,0003	DNA mismatch repair protein Msh6-1
	362	CDS	70,4	0,0014	
AT4G02160	389	CDS	78,1	0,0004	hypothetical protein
	416	CDS	71,8	0,0011	
AT4G02220	566	CDS	86,8	0,0001	zinc finger (MYND type) and programmed cell death 2 C-terminal domain-containing protein
	509	CDS	76,8	0,0005	
AT4G08230	1259	3'UTR	79,6	0,0003	glycine-rich protein
	1286	3'UTR	71,2	0,0012	
AT4G16830	796	CDS	73,8	0,0008	hyaluronan / mRNA binding domain-containing protein
	242	5'UTR	71,5	0,0011	
AT4G16940	3326	CDS	73,8	0,0008	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
	3368	CDS	73,8	0,0008	
AT4G21990	1818	3'UTR	73,5	0,0008	5'-adenylylsulfate reductase 3
	1266	CDS	72,3	0,0010	
AT4G22420	198	CDS	85,5	0,0002	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein
	317	CDS	70,2	0,0014	
AT4G27310	625	CDS	90,1	0,0001	zinc finger (B-box type) family protein
	573	CDS	79,6	0,0003	
AT4G29420	1700	3'UTR	90,8	0,0001	F-box/LRR-repeat protein
	1404	CDS	75,3	0,0006	
AT4G31610	671	CDS	88,0	0,0001	B3 domain-containing protein REM1
	629	CDS	80,2	0,0003	
AT4G31630	344	CDS	78,6	0,0004	transcriptional factor B3 family protein
	374	CDS	72,8	0,0009	
AT4G32610	816	CDS	74,8	0,0007	copper ion binding protein
	672	CDS	71,8	0,0011	
AT4G33620	4924	3'UTR	76,6	0,0005	putative ubiquitin-like-specific protease 2A
	4846	3'UTR	73,3	0,0008	
AT4G33740	689	CDS	71,2	0,0012	hypothetical protein
	573	CDS	70,5	0,0014	
AT4G35140	2869	3'UTR	75,8	0,0006	transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
	2647	3'UTR	74,6	0,0007	
AT4G36980	974	CDS	90,1	0,0001	splicing factor, arginine/serine-rich 16
	1014	CDS	72,8	0,0009	
AT4G38480	2033	3'UTR	96,9	0,0001	transducin/WD40 domain-containing protein
	2057	3'UTR	74,8	0,0007	

Сильные сайты связывания (ΔG более 90% от ΔG_m) miR414 с mRNA находятся как в CDS (2 сайта), так и в 3'UTR (2 сайта). Число сайтов с энергией взаимодействия от 80 до 90% от ΔG_m равно пяти (таблица 2), что свидетельствует о высокой вероятности их функциональной значимости для подавления трансляции mRNA соответствующих генов.

Среди 222 mRNA с одним сайтом связывания с miR414 в пяти имеются сайты с энергией взаимодействия выше 90% от ΔG_m и в 30 mRNA энергия взаимодействия составляла 80 ÷ 90% от ΔG_m (таблица 3). Мы отбирали в качестве мишеней miR414 гены, mRNA которых связывалась с энергией

более 70% от ее максимальной величины. Такой критерий выбран в связи с тем, что известны miRNA, подавлявшие трансляцию при такой силе взаимодействия. mRNA найденных генов-мишеней возможно будут слабо взаимодействовать с miR414 при ее низкой концентрации, однако концентрация miRNA в клетках может увеличиваться в сотни раз и тогда их взаимодействие с mRNA будет высоко вероятным.

Таблица 3

Характеристики связывания с высоким сродством miR414 с mRNA генов хромосомы 4 *A. thaliana*

Ген	Сайт, н.	Участок mRNA	ΔG , %	p<	Функция гена
AT4G04630	454	5'UTR	100	0,0000	hypothetical protein
AT4G05410	438	CDS	97,5	0,0001	transducin family protein / WD-40 repeat family protein
AT4G29520	1237	3'UTR	90,8	0,0001	hypothetical protein
AT4G33060	1678	3'UTR	100	0,0000	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SDCCAG10
AT4G36860	1102	CDS	91,1	0,0001	LIM domain-containing protein

Приведенные в таблице 3 данные свидетельствуют, что сайты сильного взаимодействия находятся в CDS, 3'UTR и 5'UTR. В среднем по всем 268 сайтам взаимодействия miR414 с mRNA 236 генов хромосомы 4 *A. thaliana* их доли расположения в CDS, 3'UTR и 5'UTR равны соответственно 67,9%, 26,5% и 5,6%. На основании этих данных можно предположить, что преимущественное расположение сайтов связывания в CDS способствует поддержанию консервативности этих сайтов и нуклеотидной последовательности miR414 для сохранения их регулирующей роли в процессе эволюции.

Выявленные гены-мишени для miR414 выполняют в клетках разнообразные функции и многие из них играют ключевую роль в регуляции большого числа жизненно важных процессов. Например, гены AT4G02020, AT4G00870, AT4G12610, AT4G20280, AT4G19550, AT4G31630, AT4G26930, AT4G10710, AT4G08350, AT4G27950, AT4G28140, AT4G13620, AT4G34410 и AT4G32620 являются транскрипционными факторами. Гены AT4G22350, AT4G22420, AT4G01037, AT4G22285, AT4G03510, AT4G38600, AT4G38630 и AT4G15880 кодируют убиквитин и связанные с ним ферменты, которые участвуют в регуляции пролиферации, развитии и дифференцировке клеток, реакции на стресс и патогены, репарации ДНК.

Несколько генов (AT4G40010, AT4G00340, AT4G14480, AT4G32710, AT4G37250, AT4G03153, AT4G36280, AT4G37840, AT4G33240) кодируют киназы. Ряд генов отвечают за устойчивость к заболеваниям (AT4G08450, AT4G11340, AT4G16940, AT4G16960) и стрессу (AT4G27320, AT4G32610). Гены AT4G27310, AT4G06334, AT4G02220, AT4G17570, AT4G31420 и AT4G00980 кодируют цинк-фингер белки. mRNA генов (AT4G02070, AT4G26110, AT4G02460, AT4G03130), кодирующих ферменты репарации DNA, тоже регулируются miR414.

Мишенью miR414 являются mRNA 46 генов гипотетических белков. Часть из них (AT4G01170, AT4G04614, AT4G04630, AT4G17100, AT4G19100, AT4G21970, AT4G25070, AT4G29520, AT4G33310, AT4G38260, AT4G31510,) обладают высоким сродством к miR414 с энергией гибридизации в интервале 80 ÷ 100% от ΔG_m .

Безусловно, miR414 является уникальной среди miRNA *A. thaliana*, поскольку предположительно она действует на mRNA 236 генов из 4122 генов хромосомы 4. Учитывая, что геном *A. thaliana* содержит более 27 тысяч белок-кодирующих генов, то ожидаемое число генов-мишеней для нее равно более 1500. Такое потенциально большое число генов-мишеней для miR414 значительно осложняет выяснение особенностей ее регулирующей роли в клетках растений. Даже если число генов-мишеней для miR414 окажется во много раз меньше, то и в этом случае выяснение ее влияния на множество генов-мишеней будет сложной проблемой. Например, из 236 генов-мишеней для miR414 в хромосоме 4 имеется 56 генов, mRNA которых связывает miR414 с энергией гибридизации более 80% от ΔG_m . То есть, при этом высоком критерии отбора генов-мишеней для miR414 ожидается около 370 таких генов на геном *A. thaliana*.

1. Song Q.-X., Liu Y.-F., Hu X.-Y., Zhang W.-K., Ma B., Chen S.-Y., Zhang J.-S. Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing // *BMC Plant Biology*, 2011, V.11, P.5-21.
2. Ivashuta S., Banks I., Wiggins B., Zhang Y., Ziegler T., Roberts J., Heck G. Regulation of gene expression in plants through miRNA inactivation // *PLoS ONE*, 2011, V.6, P.e21330.
3. Todesco M., Rubio-Somoza I., Paz-Ares J., Weigel D. A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Genet.*, 2010, V. 6, P.e1001031.
4. Schwab R., Palatnik J., Riester M., Schommer C., Schmid M., Weigel D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome // *Develop. Cell*, 2005, V.8, P.517-527.
5. Axtell M., Bartel D. Antiquity of MicroRNAs and their targets in land plants // *Plant Cell*, 2005, V.17, P.1658-1673.
6. Jones-Rhoades M., Bartel D. MicroRNAs and their regulatory roles in plants // *Ann.Rev. Plant Biol.*, 2006, V.57, P.19-53.
7. Nair S., Wang N., Turuspekov Y., Pourkheirandish M. et al. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided HvAP2 mRNA cleavage // *PNAS USA*, 2010, V.107, P.490-496.
8. Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // *Cell* 2009, V.136, P.215-233.
9. Willmann M., Mehalick A., Packer R., Jenik P. MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*, 2011, V.155, P.1871-1884.
10. Nodine M., Bartel D. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. // *Genes Dev.*, 2010, V.24, P.2678-2692.
11. Buhtz A., Pieritz J., Springer F., Kehr J. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility // *BMC Plant Biol.*, 2010, V.10, P.64-68.
12. Kant S., Peng M., Rothstein S. Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in *Arabidopsis* // *PLoS Genet.*, 2011, V.7, P.e1002021.
13. Valderrama-Lopez O., Yang S., Aparicio-Fabre R., Graham P., Reyes J., Vance C., Hernandez G. MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity // *New Phytol.*, 2010, V.187, P.805-818.
14. Ding Y., Chen Z., Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*) // *Journal Exper. Botany*, 2011, P.1-11, doi:10.1093/jxb/err046.
15. Khraiweh B., Zhu J.-K., Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants // *Bioch. Biophys. Acta*, 2011, doi:10.1016/j.bbagr.2011.05.001
16. Kuo H.-F., Chiou T.-J. The role of microRNAs in phosphorus deficiency signaling // *Plant Physiology*, 2011, V.156, P.1016-1024.
17. Sunkar R. MicroRNAs with macro-effect on plant stress responses // *Seminars in Cell and Devel. Biol.*, 2010, V.21, P.805-811.
18. Sunkar R., Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation // *TRENDS in Plant Science*, 2007, V.12, P.301-309.
19. Devers E., Branscheid A., May P., Krajinski F. Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis // *Plant Physiology*, 2011, V.156, P.1990-2010.
20. Бари А., Атамбаева Ш., Оразова С., Бакенова Д., Иващенко А. МикроРНК при стрессе у растений // *Вестник КазНУ им. аль-Фараби, серия биол.*, 2011, №4(50), С.34-37.

Arabidopsis thaliana 4 хромосомасының 236 ген mRNA мен miR414тің байланыс сипаттамасы анықталған. Зерттелген гендер mRNA мен miR414тің байланыс сайт саны және өзара әрекеттесу энергиясы бойынша маңызды айырмашылықтар табылған.

The characteristics of miR414 binding to 236 genes mRNA of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 are identified. Significant differences in studied genes mRNA binding sites number and energy of interaction with miR414 are established.

УДК 577.21

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

ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ МЕЖГЕННЫХ, ИНТРОННЫХ И ЭКЗОННЫХ miRNA С mRNA ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИНТРОННЫЕ miRNA

(Казакский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы)

Изучены сайты связывания 784 межгенных miRNA, 686 интронных miRNA и 49 экзонных miRNA с mRNA 52 генов, кодирующих интронные miRNA. Выявлены особенности связывания miRNA с 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA каждого гена. Установлено повышенное сродство miRNA к 5'UTR mRNA по сравнению с CDS и 3'UTR участками. mRNA 52 генов значительно отличаются по плотности расположения сайтов взаимодействия и числу связываемых miRNA. Выявлены различные типы взаимодействия miRNA с mRNA, отличающиеся по вкладу в энергию взаимодействия 5'- и 3'-участков miRNA. Интронные miRNA не связываются с mRNA генов, кодирующих эти интронные miRNA. Полученные данные способствуют пониманию механизма взаимодействия miRNA с mRNA.

Количество публикаций посвященных изучению свойств и биологической роли miRNA быстро увеличивается, что свидетельствует о возрастающем интересе к этим уникальным регуляторам экспрессии генов [1]. Важной проблемой взаимодействия miRNA с mRNA остается выяснение сайтов связывания этих молекул. Традиционно считается, что miRNA взаимодействует с mRNA только в 3'UTR [2], однако известны публикации описывающие связывание miRNA с mRNA в 5'UTR и CDS [3-