

УДК 577.21

Ш.А. Атамбаева*, О.А. Берилло, А.Т. Иващенко, А.Ю. Пыркова, Р.Е. Ниязова
Национальная нанотехнологическая лаборатория КазНУ имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
*e-mail: shara79@mail.ru

Особенности сайтов связывания miR-1285-3p, miR-5684 и семейства miR-1273 с mRNA генов человека

Проведен поиск сайтов связывания 2578 miRNA с 13000 mRNA генов человека с использованием программы MirTarget. В mRNA многих генов выявлены участки длиной около 100 н., содержащие упорядоченно расположенные сайты связывания семейства miR-1273, miR-1285-3p и miR-5684. Эти участки расположены в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA и содержат от двух до шести упорядоченно расположенных сайтов связывания с miRNA. Сайты связывания miR-1273g-3p, miR-1273a, miR-1273c, miR-1285-3p и miR-5684 перекрывались и были расположены впереди сайтов связывания miR-1273f, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273g-5p и miR-1273h-5p, сайты связывания которых тоже перекрывались. Обсуждается роль miRNA, имеющих упорядоченные сайты связывания, в регуляции экспрессии генов участвующих в онкогенезе.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, сайты связывания, гены-мишени.

Ш.А. Атамбаева, О.А. Берилло, А.Т. Иващенко, А.Ю. Пыркова, Р.Е. Ниязова miR-1285-3P, miR-5684 және miR-1273 жиынтығының адам гендерінің mRNA-мен байланысу сайттарының ерекшеліктері

13000 адам гендерінің mRNA-да 2578 miRNA-дың байланысу сайттары MirTarget бағдарламасын қолданып зерттелген. Көп гендердің mRNA-да miR-1273 жиынтығы мен miR-5684 байланыстыратын тізбектелген 100 н. учаскілер анықталған. Байланысу сайттар mRNA-ның 3'UTR, 5'UTR және CDS-де орналасқан және miRNA-мен байланысатын екіден алтыға дейін тізбектелген сайттары бар. miR-1273g-3p, miR-1273a, miR-1273c, miR-1285-3p және miR-5684-ны байланыстыратын сайттар бір біреуін жабады және бір біреуін жабатын miR-1273f, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273g-5p және miR-1273h-5p-ны байланыстыратын сайттардан кейін орналасқан. Онкогенезге қатысатын гендердің экспрессиясын реттейтін miRNA-дың ролі қарастырылған.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, байланысу сайттар, нысана гендер.

S.A. Atambayeva, O.A. Berillo, A.T. Ivashchenko, A.Y. Pyrkova, R.Y. Niyazova Features of binding sites of miR-1285-3p, miR-5684 and miR-1273 family with mRNA of human genes

We searched the binding sites of 2578 miRNA in mRNA of human genes using the MirTarget program. miRNAs of the arranged binding sites of miR-1273 family, miR-1285-3p and miR-5684 were identified in many mRNA fragments with the length equaled about 100 nt. These sites are located in the 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs of mRNAs and contain from two to six arranged miRNA binding sites. Binding sites of miR-1273g-3p, miR-1273a, miR-1273c, miR-1285-3p and miR-5684 are overlapped and located in front of miR-1273f, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273g-5p and miR-1273h-5p binding sites of, which also are overlapped. There are discussed the role of miRNAs, having arranged binding sites in the regulation of gene expression involved in tumorigenesis.

Keywords: miRNA, mRNA, binding sites, target genes.

Несмотря на рост количества публикаций об изучении биологической роли miRNA, остается еще много нерешенных проблем в данной области. miRNA осуществляют пост-транскрипционную регуляцию экспрессии белок-кодирующих генов [1]. miRNA прямо или опосредованно участвуют почти во всех основных процессах развития многоклеточных организмов [2]. Существуют разные методы предсказания генов мишеней для miRNA, но многие из них дают большое число ложноположительных результатов. Это затрудняет понимание связи между miRNA и генами-мишенями, участвующими в разных метаболических процессах. Ранее предполагалось, что сайты связывания

могут располагаться только в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) [3], но в последнее время появились публикации о функционирующих сайтах в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR) и белок-кодирующей части (CDS) [4, 5]. Нами были выявлены несколько miRNA, которые имеют несколько сот генов-мишеней. В частности, miR-1273e, miR-1273f and miR-1273g-3p и имеют 399, 654 и 809 генов-мишеней соответственно. Некоторые члены семейства miR-1273 и другие miRNA тоже связывались с этими генами-мишенями и необходимо выяснить какие свойства имеют сайты связывания этих miRNA. Изменения концентрации miRNA наблюдается при развитии рака молочной железы, рака легкого, органов желудочно-кишечного тракта и рака других локализаций [6-12]. В большинстве этих исследований выявлены изменения концентрации miRNA, но остаются недостаточно изученными их гены-мишени. Поэтому необходимо выявить особенности связывания семейства miR-1273, miR-1285-3p и miR-5684 с mRNA генов, участвующих в развитии онкологических заболеваний.

Материалы и методы

mRNA последовательности генов человека взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) используя скрипт Lextractor002 (<http://sites.google.com/site/malaheene/software>), написанный в нашей лаборатории. Нуклеотидные последовательности miRNA и информация об их происхождении взяты из базы данных miRBase (<http://mirbase.org>). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили с помощью программы MirTarget написанной в нашей лаборатории. Эта программа определяет: начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов в 5'UTR, в CDS и в 3'UTR; свободную энергию гибридизации (ΔG , kJ/mole) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Рассчитано отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равно 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. Учитываются связи не только между аденином (A) и урацилом (U), гуанином (G) и цитозином (C), G-U, но и взаимодействия между A и C через одну водородную связь.

Результаты и их обсуждение

Характеристики упорядоченных сайтов связывания в 3'UTR. В работе рассчитывали степень связывания 2578 miRNA с 13000 mRNA генов человека. Для семейства miR-1273, miR-1285-3p, and miR-5684 были отобраны сайты связывания с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90% (таблица 1). miR-1273e, miR-1273g-3p и miR-1273f имеют несколько сот генов-мишеней и являются уникальными miRNA (umiRNA). В настоящей работе анализировали гены mRNA которых связывались с двум и более miRNA.

Таблица 1 - Количественные данные сайтов связывания семейства miR-1273, miR-1285-3p и miR-5684

miRNA	Количество генов-мишеней	Количество сайтов связывания	Количество сайтов в 5'UTR	Количество сайтов в CDS	Количество сайтов в 3'UTR
miR-1273a	145	151	6	2	143
miR-1273c	80	81	7	2	72
miR-1273d	102	104	5	6	93
miR-1273e	399	431	18	9	404
miR-1273f	654	742	30	26	686
miR-1273g-3p	809	945	42	28	875
miR-1273g-5p	32	32	2	5	25
miR-1273h-5p	98	99	6	8	85
miR-1285-3p	127	130	8	2	120
miR-5684	189	200	9	7	184

Эти miRNA образуют две группы с упорядоченными сайтами связывания расположенными на участке mRNA длиной около 100 н. (Рисунок 1). Упорядоченные сайты связывания miRNA это несколько разных сайтов, которые имеют перекрывающиеся нуклеотидные последовательности. В группу miR-1273g-3p входят miR-1273a, miR-1273c, miR-1285-3p и miR-5684 (Рисунок 1). Между концом сайта связывания miR-1273g-3p и началом сайта связывания miR-1273f расстояние равно 12

имели по 2 сайта. Двенадцать генов имели сайты связывания с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ более 96%. mRNA генов *CD59*, *FAIM* и *TMCI* имели по одному сайту связывания с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ более 98%. Поэтому экспрессия этих генов будет сильно подавляться при сравнимых концентрациях mRNA и miRNA. Гомология нуклеотидных последовательностей в участках 5'UTR высокая, что свидетельствует о важности сайтов связывания в функционировании этих генов (рисунок 1 А, Б). Поскольку сайты связывания miRNA распределялись в 5'UTR также, как и в 3'UTR, то эти участки, вероятно, происходят от одного предшественника.

Характеристики упорядоченных сайтов связывания в CDS. В 100-нуклеотидных участках CDS 42 генов выявлено 95 упорядоченно расположенных сайтов связывания. CDS 26 mRNA имели по 2 сайта связывания. CDS генов *ARGFX*, *FAHD1*, *FRRS1*, *GINS3*, *MKNK1*, *PRR16*, *RFC5*, *RNF135*, *SPAG6* и *ZNF573* имели по 3 сайта связывания. В CDS генов *SGCE*, *TRIM54*, *NEK4* и *ADARB1* имелось по четыре упорядоченных сайта связывания. Восемь генов имели сайты связывания с $\Delta G/\Delta G_m$ более 96%. mRNA генов *ADARB1* и *GINS3* имели сайты связывания с $\Delta G/\Delta G_m$ более 98%. miR-1273h-5p имеет полностью комплементарный сайт связывания с mRNA гена *GINS3*. Экспрессия этих генов будет сильно подавляться при сравнимых концентрациях mRNA и miRNA. Поскольку участки CDS, содержащие сайты связывания miRNA имеют гомологичные нуклеотиды, то они должны кодировать гомологичные олигопептиды. Для mRNA генов *ADARB1*, *FAHD1*, *FRRS1*, *SGCE* и *ZNF573* эти участки транслируются в одной рамке считывания и соответствующие олигопептиды являются высоко гомологичными в доменах соответствующих сайтам связывания с miRNA. Например, в белках *SGCE* и *ZNF573*, эти домены содержат идентичные олигопептиды AQAQGVQW и SLQFPFPP. В mRNA генов *SPAG6*, *TRIM54* и *RFC5* трансляция идет в другой рамке считывания и кодирует другие олигопептиды. Полученные данные свидетельствуют о том, что консервативность сайтов связывания в CDS является более важным условием, по сравнению с сохранением в белке аминокислот кодируемых сайтами связывания miRNA.

В результате наших исследований установлено, что miR-1273a, miR-1273c, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1273g-5p, miR-1273h-3p, miR-1273h-5p, miR-5684 и miR-1285-3p имели от 32 до 945 упорядоченных сайтов связывания. Выявленное упорядоченное расположение сайтов связывания этих miRNA сохраняется в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA всех генов-мишеней. 2915 упорядоченно расположенных сайтов служат мишенями для miRNA в разных сочетаниях. По-видимому, 100-нуклеотидный участок mRNA с сайтами связывания изученных miRNA является важным регуляторным звеном, посредством которого происходит управление экспрессией генов мишеней несколькими miRNA. Экспрессия 949 генов-мишеней семейства miR-1273, miR-1285-3p, and miR-5684 может зависеть от экспрессии хозяйских генов *RGS22*, *TIAM2*, *KIF1B*, *KRIT1*, *SCP2* и *HOOK2*, кодирующих интронные miRNA. Так как белки генов-мишеней, изученных miRNA, участвуют в разных метаболических процессах, то предполагаемая регуляция их экспрессии через связывание с miRNA имеет важное биологическое значение и не является случайной. Белки большинства изученных генов-мишеней участвуют в разных процессах клетки, включая апоптоз и клеточный цикл, которые определяют развитие многих патологий. Другие гены являются онкогенами, онкосупрессорами, транскрипционными факторами и т.д. Выбранные нами гены связаны с их участием в развитии заболеваний, включая рак легкого, рак молочной железы, рак органов желудочно-кишечного тракта. Поэтому изменение регуляция экспрессии этих генов-мишеней посредством изученных miRNA может служить причиной многих заболеваний. К сожалению, в литературе мало сведений об участии изученных miRNA, за исключением miR-1285, в развитии онкологических заболеваний. Ранее нами было выявлен miR-1285 сайт связывания в mRNA ключевого онкосупрессора TP53 с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным 98.7% и эффективность этого сайта была подтверждена [12]. MiR-1285 значительно ингибирует пролиферацию, инвазию и миграцию клеток карциномы почки [8] и выявлен как один из биомаркеров рака простаты [9]. Концентрация miR-1285 снижается почти в 10 раз при почечной карциноме [11]. Изменения концентрации уникальных miRNA могут привести к развитию заболеваний, включая рак.

Литература

1 Lai E.C. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation // Nat. Genet. - 2002. - Vol. 30. - No. 4. - P. 363-364.

- 2 Doxakis E. Principles of miRNA-target regulation in metazoan models // *Int. J. Mol. Sci.* - 2013. - Vol. 14. - No. 8. - P. 16280-16302.
- 3 Zhou P., Xu W., Peng X., Luo Z., Xing Q., Chen X., *et al.* Large-Scale Screens of miRNA-mRNA Interactions Unveiled That the 3'UTR of a Gene Is Targeted by Multiple miRNAs // *PLoS One.* 2013. - Vol. 8. - No. 7. - P. e68204.
- 4 Hausser J., Syed A.P., Bilen B., *et al.* Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation // *Genome Res.* 2013. - Vol. 23. - No. 4. - P. 604-615.
- 5 Marín R.M., Sulc M., Vaníček J. Searching the coding region for microRNA targets // *RNA.* 2013. - Vol. 19. - No. 4. - P. 467-474.
- 6 Niemoeller O.M., Niyazi M., Corradini S., Zehentmayr F., Li M., Lauber K., Belka C. MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation // *Radiat Oncol.* 2011. - Vol. 31. - No. 6. - P. 29.
- 7 Cazzoli R., Buttitta F., Di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Rom W.N., Pass H.I. microRNAs Derived from Circulating Exosomes as Noninvasive Biomarkers for Screening and Diagnosing Lung Cancer // *J Thorac Oncol.* 2013. - Vol. 8. - No. 9. - P. 1156-1162.
- 8 Hidaka H., Seki N., Yoshino H., Yamasaki T., Yamada Y., Nohata N., *et al.* Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma // *Oncotarget.* 2012. - Vol. 3. - No. 1. - P. 44-57.
- 9 Chen Z.H., Zhang G.L., Li H.R., Luo J.D., Li Z.X., *et al.* A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate.* 2012. - Vol. 72:1443-1452.
- 10 Issabekova A. Berillo O., Regnier M., Ivashchenko A. Interactions of intergenic microRNAs with mRNAs of genes involved in carcinogenesis // *Bioinformatics.* 2012. - Vol. 8. - No. 11. - P. 513-518.
- 11 Tan K.S., Armugam A., Sepramaniam S., Lim K.Y., Setyowati K.D., *et al.* Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients // *PLoS One.* 2009. - Vol. 4. - No. 11. - P. e7689.
- 12 Tian S., Huang S., Wu S., Guo W., Li J., He X. MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region // *Biochem. Biophys. Research Comm.* 2010. - Vol. 396. - No. 2. - P. 435-439.

УДК 615.1:615.451:615.012.6:620.3:616-002.5

¹А.Н. Бекзат*, ²А.Б. Карабалин, ²С.А. Туткышбаев, ¹М.К. Гильманов

¹НИИ проблем биологии и биотехнологии, КазНУ имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

²Национальный Центр проблем туберкулеза МЗ РК, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: baltakay@mail.ru

Создание и испытание нового микрокапсулярного лекарственного препарата для эффективного лечения костного туберкулеза

Были разработаны комбинированные микрокапсулы, состоящие из фосфатидилинозитола (ФИ) и белка. Эти микрокапсулы были загружены этанбутолом, изониазидом, пиразинамидом и рифампицином. Морские свинки и кролики были заражены костным туберкулезом. Лечение опытных животных проводили наномазью содержащей микрокапсулы загруженные антибиотиками. Лечение наномазями дало лучший и более быстрый результат, чем лечения инъекционными антибиотиками. Количество антибиотиков в микрокапсулах и количество антибиотиков прошедших через кожно-мышечные покровы определяли с помощью HPLC хроматографии.

Ключевые слова: фосфатидилинозитол, ФИ микрокапсулы, микобактерии, тонкослойная хроматография, лечение костного туберкулеза

А.Н. Бекзат, А.Б. Карабалин, С.А. Туткышбаев, М.К. Гильманов

Сүйек туберкулезін эффективті емдеу үшін жаңа микрокапсулалы дәрілік препаратын жасау және сынау

Фосфатидилинозитол және протеиннен тұратын комбинирленген микрокапсулалар жасалынды. Бұл микрокапсулаларға этанбутол, изониазид, пиразинамид және рифампицин антибиотиктері жүктелінді. Жұмыс барысында америка торайлары және қояндар сүйек туберкулезімен жүктелінді. Сынама жануарларды емдеуге құрамында антибиотикпен жүктелген микрокапсулалары бар наномай қолданылды. Наномаймен емделу инъекциялық емдеу әдісіне қарағанда әлде қайда жақсы нәтижені көрсетті. HPLC хроматография арқылы микрокапсулалардың ішіндегі және тері мен бұлшықеттен өтетін антибиотиктердің мөлшері анықталды.

Түйін сөздер: фосфатидилинозитол, ФИ микрокапсулалар, микобактериялар, жұқа хроматография, сүйек туберкулезін емдеу

A.N Bekzat, A.B Karabalin, S.A Tutkyshbaev, M.K Gilmanov

Development and testing of a new microcapsular preparation for effective treatment of bone tuberculosis

The phosphatidylinositol (PI) and protein consisting combined microcapsules was developed. These microcapsules were loaded etanbutol, isoniazid, pyrazinamide, and rifampin. Guinea pigs and rabbits were infected by bone