

расположение нескольких групп сайтов связывания. В 2D-структуре mRNA гена *SPN* установлено расположение упорядоченных групп сайтов связывания в 3'UTR.

Ключевые слова: mRNA, miRNA, сайты связывания, апоптоз.

Д.В. Задубенко, О.А. Берилло

Апоптозға қатысатын miRNA-ның mRNA гендерімен байланысу сайттарының ерекшеліктері

Адам клеткаларының апоптозына қатысатын 18 miRNA-ның mRNA 41 гендерімен байланысу сайттарын іздестіру жұмыстары жүргізілді. MirTarget бағдарламасын пайдалана отырып miRNA-ның mRNA-мен гибридизацияның бос энергиясы 90% және одан жоғары болатын байланысу сайттары іріктеліп алынды. miR-566, miR-619-5p, miR-1268a, miR-1268b, miR-1273a, miR-1273c, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-3p, miR-1285-5p, miR-1972, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p және miR-5585-5p-ларының 2-ден 21-ге дейін нысана-гендерінің болатындығы анықталды. Бірнеше байланысу сайттарының кезектесіп орналасу орындары белгілі болды. mRNA-ның *SPN* генінің екінші реттік құрылымында 3'UTR-де байланысу сайттары топтарының кезектесіп орналасу реттілігі анықталды.

Түйін сөздер: mRNA, miRNA, байланысу сайттары, апоптоз.

D.V. Zadubenko, O.A. Berillo

Features of miRNA binding sites with mRNAs of apoptosis genes

A search for 19 miRNA binding sites in miRNAs of 41 human genes of apoptosis was realized using a program MirTarget. The binding sites were selected with the free energy of hybridization that was equaled 90% or more. It was found that miR-466, miR-566, miR-619-5p, miR-1268a, miR-1268b, miR-1273a, miR-1273c, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-3p, miR-1285-5p, miR-1972, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p and miR-5585-5p had from 2 to 21 target genes. An arranged localization of several groups of miRNA binding sites was revealed. The relative position of arranged groups was shown in the 2-dimensional structure of the 3'UTR of *SPN* gene.

Keywords: miRNA, mRNA, apoptosis, binding sites.

Апоптоз является одним из главных механизмов защиты организма от злокачественных новообразований [1]. Нарушения запрограммированной гибели клеток может выполнять ключевую роль при онкогенезе [2]. Экспрессия генов участвующих в апоптозе может ингибироваться microRNA (miRNA). microRNA являются короткими нуклеотидными последовательностями с длиной от 16 до 27 нуклеотидов [3]. Они способствуют подавлению транскрипции, связываясь с miRNA белок-кодирующих генов человека [4]. Концентрация miRNA значительно увеличивается при развитии онкологических заболеваний и они могут являться маркерами онкогенеза. [5, 6]. Концентрация некоторых miRNA повышена более чем в 2 раза в опухолевых клетках молочной железы [7] и в 5-20 раз в опухоли легкого по сравнению с нормальными клетками [8]. Во многих работах показаны изменения концентрации отдельных miRNA, но их гены-мишени мало изучены. Следовательно, важно определить miRNA, которые связываются с mRNA генов участвующих в апоптозе. На сегодняшний день в геноме человека известно более 2500 miRNA, но многие из них еще не изучены. Нами отобраны гены, участвующие на разных этапах реализации запрограммированной клеточной смерти. С помощью программы MirTarget, написанной в нашей лаборатории можно найти miRNA потенциально способные связываться с mRNA генов с высоким уровнем достоверности. Расположение сайтов связывания miRNA в вторичной структуре mRNA не изучено. В связи с этими нерешенными вопросами были поставлены следующие задачи работы: 1) выявить сайты связывания miRNA с mRNA генов участвующих в апоптозе; 2) выявить особенности взаимодействия и расположения miRNA в различных областях mRNA генов, участвующих в запрограммированной смерти клеток; 3) охарактеризовать расположение сайтов связывания miRNA в 2D-структуре mRNA генов участвующих в апоптозе.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности mRNA генов человека получены из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) через использование компьютерной программы Lextractor002 (http://sites.google.com/site/mala_heenee/software). miRNA взяты из miRBase (<http://mirbase.org>). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили используя программу MirTarget, написанную в нашей лаборатории. Программа определяет: начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), в белок-кодирующей части (CDS) и в 3'UTR mRNA;

свободную энергию гибридизации (ΔG , kJ/mole) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Для каждого сайта рассчитывали отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равно свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отбирали с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида 5'UTR mRNA. Для построения 2D-структуры использовали программу UNAFold 3.7 (<http://unafold.software.informer.com/>).

Особенностью программы MirTarget является учет взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA генов-мишеней не только между аденином (A) и урацилом (U), гуанином (G) и цитозином (C), G-U, но и между A и C посредством одной водородной связи [9]. Расстояние между A и C равно расстоянию между нуклеотидами G-C, A-U, G-U [10].

Результаты и обсуждение

Ранее в нашей лаборатории были предсказаны сайты связывания 2563 miRNA в 13000 генах человека с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90% (неопубликованные данные). Эти гены были выбраны как участники онкогенеза, включая рак легкого и молочной железы. Было отобрано 12 miRNA имеющих число сайтов связывания свыше 400 генов-мишеней для каждой и упорядоченное расположение сайтов относительно друг друга в пределах своей группы. Большинство из miRNA имеют интронное происхождение (in-miRNA), остальные являются межгенными (ig-miRNA). В настоящей работе изучены следующие miRNA: in-miR-619-5p (*SSH1*), in-miR-1273a (*RGS22*), in-miR-1273c (*TIAM2*), in-miR-1273d (*KIF1B*), miR-1273e (происхождение не установлено), miR-1273f (кодируется в 5'UTR гена *SCP2*), in-miR-1273g-3p (*SCP2*), in-miR-1273h-5p (*PRKCB*), miR-1285-3p (кодируется в интроне гена *KRIT1* и межгенном участке), in-miR-5095 (*SCP2*), in-miR-5096 (*BMP2K*) и in-miR-5585-3p (*TMEM39B*), где в скобках указаны хозяйские гены, в которых кодируются интронные miRNA. miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585-3p образуют одну группу с упорядоченно расположенными сайтами связывания [11] и семейство miRNA miR-1273 с miR-1285-3p образуют другую группу [12-13]. В настоящей работе нами выявлены еще шесть других miRNA (in-miR-566 (*SEMA3F*), ig-miR-1268a, in-miR-1268b (*CCDC40*), in-miR-1285-5p (*KRIT1*), in-miR-1972 (*PDXDC1*, *PDXDC2P*) и in-miR-5585-5p (*TMEM39B*)), сайты связывания которых располагаются рядом с выявленными группами упорядоченных сайтов.

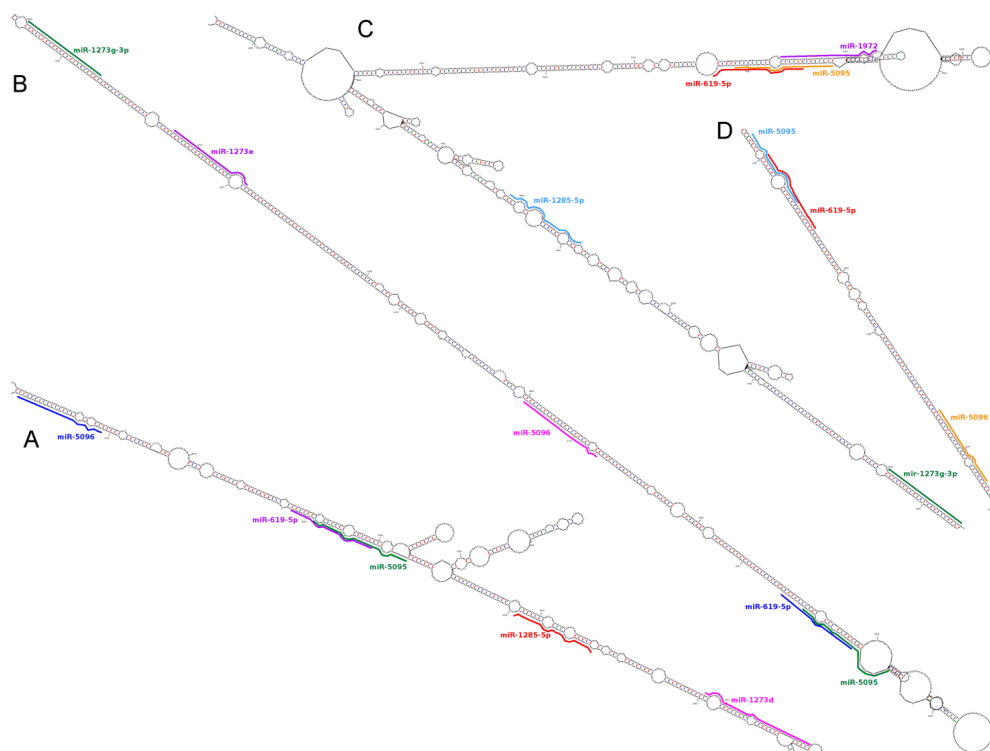
В mRNA 41 генов участвующих в апоптозе, нами выявлено 149 сайтов связывания miRNA расположенные в 3'UTR, 8 сайтов – в 5'UTR и 4 сайта – в CDS с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. *BMP2K*, *CCDC40*, *KIF1B*, *KRIT1*, *PDXDC1*, *PDXDC2P*, *PRKCB*, *RGS22*, *SCP2*, *SEMA3F*, *SSH1*, *TIAM2* и *TMEM39B* являются хозяйскими генами изученных miRNA. Следовательно экспрессия 41 гена-мишени апоптоза может зависеть от экспрессии этих хозяйских генов. Таким образом выявляется связь между генами, которые выполняют разные функции в клетке.

Ранее были выделены две группы с упорядоченно расположенными сайтами связывания: семейства miR-1273 и miR-619-5p. Группа сайтов связывания miRNA семейства miR-1273 упорядоченно расположена в 100-нуклеотидных участках mRNA и состоит из двух подгрупп: miR-1273g-3p и miR-1273f [12, 13]. В группу miR-1273g-3p входят miR-1273a, miR-1273c, miR-1285-3p и miR-5684. Расстояние между концом сайта связывания miR-1273g-3p и началом сайта связывания miR-1273f равно 12 нуклеотидам. В группу miR-1273f входят miR-1273d, miR-1273e, miR-1273g-5p, miR-1273h-5p. Нуклеотидные последовательности сайтов связывания представителей каждой группы частично совмещены.

В группу miR-619-5p входят упорядоченные сайты связывания miR-5095, miR-619-5p, miR-5096 и miR-5585-3p, расположенные в участке mRNA длиной 180 нуклеотидов [11]. Степень гомологии нуклеотидных последовательностей высокая не только в самих сайтах связывания, изученных miRNA, но и в между сайтами. Сайты связывания miR-5095 и miR-619-5p частично совмещены. Расстояние между сайтами связывания miR-5095 и miR-5096 равно 57-59 нуклеотидов и расстояние между miR-5096 и miR-5585-3p равно 46-47 нуклеотидов.

Некоторые mRNA имеют по несколько групп упорядоченных сайтов связывания. Например, mRNA гена *DFFA* имеет 4 группы упорядоченно расположенных сайтов связывания: miR-5095 и miR-619-5p; miR-5585-3p и miR-1285-5p; miR-5095, miR-619-5p и miR-1285-5p; miR-619-5p и miR-5585-3. mRNA гена *SPN* имеет 7 групп упорядоченно расположенных сайтов связывания в разных сочетаниях: miR-1273a, miR-1273c и miR-1273f; miR-5095, miR-619-5p и miR-5096; miR-1273d и miR-

1972; miR-5095, miR-619-5p и miR-1285-5p. В 3'UTR генов-мишеней *DFFA*, *VHL* и *SPN* расположено 10, 14 и 29 сайтов связывания соответственно.



Жирными линиями показаны области сайтов связывания miRNA с mRNA гена *SPN*.

- A — представлены сайты связывания miR-5096, miR-619-5p, miR-5095, miR-1285-5p и miR-1273d.
 B — представлены сайты связывания miR-1273g-3p, miR-1273e, miR-5096, miR-619-5p и miR-5095.
 C — представлены сайты связывания miR-1972, miR-619-5p, miR-5095, miR-1285-5p и miR-1273g-3p.
 D — представлены сайты связывания miR-5095, miR-619-5p и miR-5096.

Рисунок 1 - Сайты связывания miRNA с mRNA гена *SPN* представленные на 2D-структуре.

mRNA гена *SPN* состоит из 5'UTR длиной 136н., CDS – 1202н. и 3'UTR – 5576н. Вторичная структура 3'UTR mRNA *SPN* представлена 3 длинными шпильками с большим количеством комплементарных пар нуклеотидов, в которых локализовано несколько упорядоченных сайтов связывания с miRNA (рисунок 1A-D). Сайты связывания изученных miRNA расположены с двух сторон стеблей mRNA гена *SPN*, которые имеют от одного до двух сайтов связывания, локализованные на противоположной стороне вторичной структуры mRNA. Для того, чтобы miRNA в составе RISC-комплекса связалась с почти комплементарной последовательностью mRNA гена-мишени, ей необходимо преодолеть силу взаимодействия двух цепей mRNA. Сайты связывания часто расположены в тех районах mRNA, где имеются несколько не комплементарных нуклеотидов (1-3 «пузыря»), которые дестабилизируют данный участок. С такими участкам mRNA легче взаимодействовать miRNA, образуя больше комплементарных связей.

Совмещенные сайты связывания miR-619-5p и miR-5095 представлены на рисунке 1A-D. На рисунке 1A представлены сайты связывания miRNA (miR-1285-5p и miR-1273d), которые располагаются с двух сторон одного фрагмента вторичной структуры mRNA *SPN* на расстоянии 28 нуклеотидов. На рисунках A, B представлены две отдельные группы с сайтами связывания, которые располагаются с противоположных цепей mRNA. Это группы генов семейства miR-1273 и miR-619-5p.

На рисунке 1C представлены сайты связывания miRNA (miR-1972 и miR-5095), которые располагаются с двух сторон со смещением 13 нуклеотидов комплементарных цепей одного фрагмента вторичной структуры mRNA *SPN*. С одной стороны расположены сайты связывания с miR-5095 и miR-619-5p и на комплементарной цепи со смещением локализован сайт miR-1972.

2D-структура рисунка 1B является продолжением шпильки mRNA, представленной на рисунке 1C. На рисунке 1B,C изображен сайт для связывания с miR-1273g-3p, где данный участок «стебля» mRNA имеет высокую степень комплементарности и устойчивую к дестабилизации. Расположение одиночных сайтов связывания в таких районах является малоэффективным для реализации ингибирования трансляции mRNA. На рисунке 1B представлены две группы с упорядоченно расположенными сайтами связывания miRNA (miR-1273g-3p, miR-1273e и miR-5096, miR-619-5p, miR-5095), которые располагаются с двух сторон одного стебля шпильки на расстоянии 85 нуклеотидов. Возможно, что такое расположение сайтов связывания с miRNA позволяет более достоверно дестабилизировать mRNA с двух сторон одного фрагмента. На рисунке 1D представлены три упорядоченно расположенных сайта связывания (miR-619-5p, miR-5095 и miR-5096), первые два из них имеют 15 общих нуклеотидов.

Изученные miRNA могут связываться с mRNA-мишенями в зависимости от сродства к этим mRNA и их концентрации. В большей степени будет происходить снижение скорости трансляции mRNA с высоким сродством к выявленным miRNA и находящаяся в меньшей концентрации по сравнению с miRNA. Значительная экспрессия генов-мишеней относительно изучаемых miRNA будут иметь низкое сродство к ней и будут менее зависимы от нее. Изменения экспрессии miRNA, которые могут связываться с высокой степенью комплементарности со многими mRNA генов и могут привести к дисбалансу экспрессии генов всего генома клетки. Сверхэкспрессия этих miRNA может привести к снижению трансляции mRNA генов апоптоза, что может привести к созданию условий для развития онкологических заболеваний.

Полученные результаты являются основой для дальнейшего исследования биологической роли этих miRNA в процессе апоптоза. Важным результатом работы является установление сайтов связывания miRNA во всех областях mRNA и выявление упорядоченности расположения их сайтов на вторичной структуре mRNA.

Литература

- 1 Li CY, Wang Y, Wang HL, Shi Z, An N, Liu YX, et al. Molecular mechanisms of Lycoris aurea agglutinin-induced apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma A549 cells, both in vitro and in vivo // *Cell Prolif.* 2013. - Vol. 46. - No. 3. - P. 272-282.
- 2 Berge EO, Knappskog S, Geisler S, Staalesen V, Pacal M, Børresen-Dale AL, Puntervoll P, Lillehaug JR, Lønning PE. Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers // *Mol Cancer.* 2010. - Vol. 9. - P. 173.
- 3 Chen, Kevin; Rajewsky, Nikolaus. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs // *Nature Reviews Genetics* 2007. - Vol. 8. - No. 2. - P. 93-103.
- 4 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // *Cell* 2009. 136. - Vol. 2. - No. P. 215-233.
- 5 Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, Dahlsveen IK. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids // *Methods.* 2013. - Vol. 59. - No. 1. - P. 1-6.
- 6 Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues // *J Exp Clin Cancer Res.* 2012. - Vol. 6. - No. 31 - P. 54.
- 7 Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, Li J. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer // *PLoS One.* 2012. - 7. - No. 10 - P. e47003.
- 8 Jang JS, Simon VA, Feddersen RM, Rakhshan F, Schultz DA, Zschunke MA, Lingle WL, Kolbert CP, Jen J. Quantitative miRNA expression analysis using fluidigm microfluidics dynamic arrays // *BMC Genomics.* 2011. - Vol. 9. - No. 12. - P. 144.
- 9 Kool E.T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2001. - Vol. 30. - P. 1-22.
- 10 Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Res.* 2002. - Vol. 30. - No. 16. - P. 3497-3531.
- 11 Иващенко А.Т., Берилло О.А., Ниязова Р.Е., Пыркова А.Ю., Атамбаева Ш.А. Особенности сайтов связывания miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585-3p с mRNA генов человека // *Вестник КазНУ серия биологическая.* 2013. - Т. 3(58) - С. 24-29.
- 12 Берилло О.А., Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е., Пыркова А.Ю., Атамбаева Ш.А. особенности сайтов связывания miRNA семейства miR-1273 с mRNA генов человека // *Вестник КазНУ серия биологическая.* 2013. - Т. 3(58) - С. 30-35.
- 13 Атамбаева Ш.А., Берилло О.А., Иващенко А.Т., Пыркова А.Ю., Ниязова Р.Е. Особенности сайтов связывания miR-1285-3p, miR-5684 и семейства miR-1273 с mRNA генов человека // *Вестник КазНУ серия биологическая.* 2013. - Т. 3(58) - С. 36-41.