

УДК 577.21

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

Особенности сайтов связывания miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585-3p с mRNA генов человека

Изучено связывание 2037 hsa-miRNA с mRNA 12175 генов человека. miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 могут с высоким сродством связываться с mRNA 1215, 832, 725 и 655 генов, соответственно. Эти miRNA имеют сайты связывания в 3'UTR, CDS и 5'UTR. В mRNA некоторых генов имеются множественные сайты связывания с miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585-3p. Установлено несколько групп генов с упорядоченным расположением сайтов связывания с miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585-3p. Обсуждаются возможные функциональные свойства изученных miRNA.

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

А.Т. Иващенко, О.А. Берилло, Р.Е. Ниязова, А.Ю. Пыркова, Ш.А. Атамбаева miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 және miR-5585-3p-ның адам гендерінің mRNA-мен байланысу сайттарының ерекшеліктері

12175 адам гендерінің mRNA-мен 2037 miRNA-дың байланысуы зерттелген. miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 және miR-5585-3p-ның сәйкес 1215, 832, 725 және 655 гендердің mRNA-мен байланысу қабілеті жоғары. Байланысу сайттар 3'UTR, CDS және 5'UTR-де орналасқан. Кейбір гендердің mRNA-да miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 және miR-5585-3p-ны бірге байланыстыратын сайттары бар. Мақалада көрсетілген miRNA-ның функционалды қасиеттері қарастырылған.

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

А.Т. Ivashchenko, O.A. Berillo, R.Y. Niyazova, A.Y. Pyrkova, S.A. Atambayeva Features of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p with mRNA of human genes

We searched the binding sites of 2037 miRNA in mRNA of 12175 human genes. Binding sites are located in the 3'UTRs, 5'UTRs and CDSs of target genes. miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p can bind with high affinity with mRNA of 1215, 832, 725 and 655 genes respectively. mRNA of some genes have multiple binding sites for miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p. Several groups of genes, that have arranged miR-619-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p binding sites. We discuss the functional properties of the studied miRNA.

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

miRNA участвуют в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов на посттранскрипционном этапе [1]. miRNA в составе RISC-комплекса (RNA-induced silencing complex) связываются с mRNA и препятствуют трансляции, либо способствуют разрушению mRNA [2]. За 20 лет изучения свойств miRNA установлено их влияние на экспрессию множества генов, участвующих во всех ключевых процессах клеток. Показано их действие на клеточный цикл [3], апоптоз [4], дифференцировку [5], рост и развитие растений [6] и животных [7]. Установлена связь экспрессии miRNA с развитием различных заболеваний. Концентрация miRNA изменяется при онкологических [8] и сердечно-сосудистых заболеваниях [9]. Нарушения метаболизма тоже связаны с изменением концентрации miRNA в клетках [10]. Путем использования miRNA удастся нормализовать некоторые процессы [11]. Этот не полный перечень участия miRNA в биологических процессах свидетельствует об их важной биологической роли.

Несмотря на значительные успехи в изучении свойств miRNA имеются проблемы в установлении генов-мишеней miRNA. Как правило одна miRNA действует на mRNA одного гена. Однако, есть miRNA, которые связываются со многими mRNA, и одна mRNA является мишенью для многих miRNA. Эти обстоятельства существенно затрудняют как изучение свойств miRNA, так и применение их для диагностических и лечебных целей. В настоящее время, в геноме человека имеется более 2500 miRNA и предполагается их действие на экспрессию более 50% генов человека. Пока не будет установлена связь большинства miRNA с их генами-мишенями, будет трудно однозначно делать выводы об участии miRNA в определенных биологических процессах.

Недавно нами были обнаружены уникальные miRNA, имеющие по несколько сот генов-мишеней, с mRNA которых они связываются с высоким сродством. Сайты связывания этих уникальных miRNA упорядоченно расположены в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), в белок-кодирующей части (CDS) и в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) mRNA. В настоящей работе изучены еще несколько уникальных miRNA, которые упорядоченно связываются с mRNA нескольких сот генов человека.

Материалы и методы

mRNA последовательности генов человека взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) при использовании скрипта Lextractor002 (<http://sites.google.com/site/malaheenee/software>), написанного в нашей лаборатории. Нуклеотидные последовательности miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 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 mRNA; 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 посредством одной водородной связи

Результаты и их обсуждение

Свойства miR-619-3p, miR-5096, miR-5585-5p и miR-5095. В работе рассчитывали степень связывания 2037 miRNA с mRNA 12175 генов человека. miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 могут связывать более 600 генов. Эти miRNA были названы уникальными (umiRNA). miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 имеют различное происхождение, длину, количество и свойства сайтов связывания. Некоторые характеристики этих уникальных miRNA изложены ниже.

miR-619-5p имеет длину 22 н. и кодируется в интроне гена *SSH1*, локализованном в 12 хромосоме. Мы обнаружили, что miR-619-5p имеет 1811 сайтов связывания в 1215 mRNA генов-мишеней. Из них 1772 сайтов связывания miR-619-5p локализованы в 3'UTR, 26 сайтов – в 5'UTR и 13 сайтов – в CDS. mRNA 197 генов имеют полностью комплементарные сайты связывания с miR-619-5p. mRNA 27 генов имеют по четыре сайта связывания и семь генов имели по пять сайтов связывания. mRNA генов *CABP4*, *CATAD1*, *GK5*, *POLH* и *PRR11* имеют по шесть сайтов связывания с miR-619-5p, mRNA генов *OPA3* и *CYP20A1* имеют по восемь и десять сайтов связывания соответственно. Все эти сайты располагаются в 3'UTR.

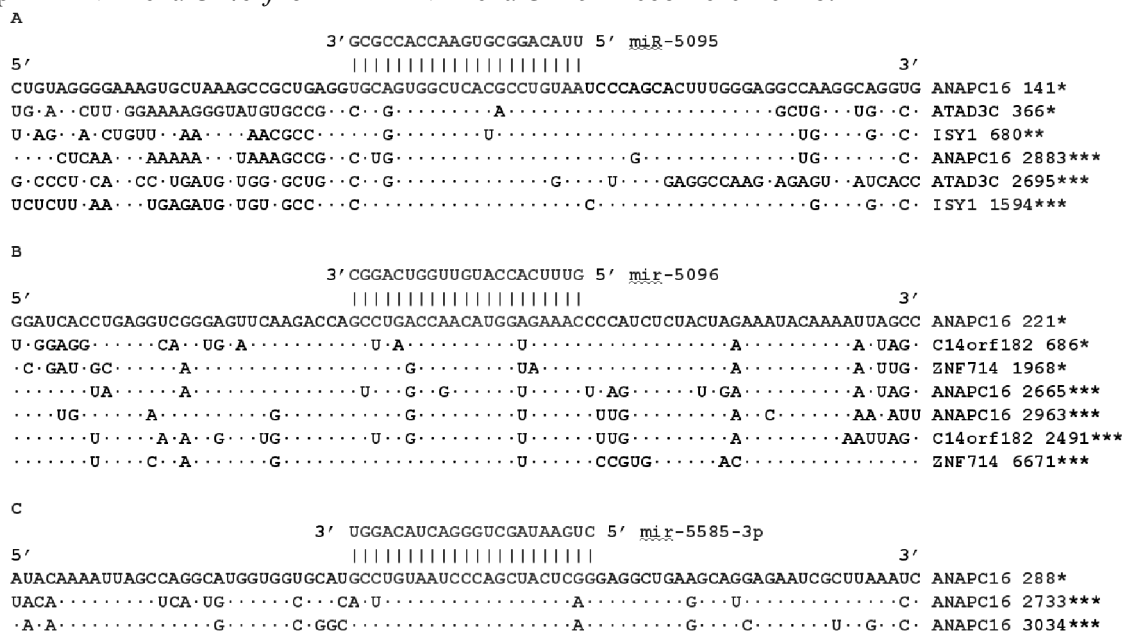
miR-5096 имеет длину 21 н. и кодируется в интроне гена *BMP2K*, локализованном на четвертой хромосоме. Мы обнаружили, что 997 сайтов связывания с miR-5096 локализованы в 832 mRNA генов-мишеней. Из них, 984 сайта связывания расположены в 3'UTR, 9 сайтов – в 5'UTR и 4 сайта – в CDS. mRNA 42 генов имеют полностью комплементарные сайты связывания с miR-5096. mRNA гена *IP09* имеют четыре сайта связывания, *PRR11* – пять сайтов, а mRNA генов *OPA3* и *CYP20A1* – шесть сайтов соответственно. Все эти сайты связывания локализованы в 3'UTR.

miR-5585-3p имеет длину 22 н. и кодируется в интроне гена *TMEM39B*, локализованном на четвертой хромосоме. Мы обнаружили, что 725 mRNA генов-мишеней имеют 844 сайта связывания с miR-5585-3p. Девять из них расположены в 5'UTR, два сайта – в CDS и 833 сайта – в 3'UTR. mRNA генов *CYP20A1* и *GPR155* имеют по четыре сайта связывания.

miR-5095 имеет длину 21 н. и кодируется в интроне гена *SCP2*, локализованного на первой хромосоме. 655 mRNA генов-мишеней имеют 734 сайта связывания. 14 из них расположены в 5'UTR, восемь – в CDS и 712 – в 3'UTR. mRNA двух генов имеют полностью комплементарные сайты связывания с miR-5095. mRNA генов *OPA3* и *SPN* имеют по четыре сайта связывания.

Сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR. С помощью MirTarget программы были предсказаны сайты связывания miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 в 5'UTR, CDS и 3'UTR нескольких генов. Более одного сайта связывания miRNA обнаружено в 5'UTR нескольких генов. Например, miR-619-5p имеет по два сайта связывания в 5'UTR mRNA *ANAPC16*, *CYB5D2*, *PRR5* генов и три сайта связывания в mRNA гена *DNASE1*.

В mRNA некоторых генов выявлены сайты связывания с каждой из miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 в 5'UTR и 3'UTR, или CDS и 3'UTR. Например, 5'UTR и 3'UTR генов *ATAD3C* и *CYB5RL* имеют сайты связывания с miR-619-5p, а CDS и 3'UTR генов *C8orf44*, *ISY1* и *ZNF714* имеют сайты связывания с miR-619-5p. В 5'UTR и 3'UTR гена *ANAPC16* выявлены сайты связывания для miR-5095, miR-5096 и miR-5585 (рисунок 1, А-С). В 5'UTR и 3'UTR гена *ATAD3C* выявлены сайты связывания с miR-5095 и miR-619-5p. В 5'UTR и 3'UTR найдены сайты связывания с miR-5096 и miR-619-5p в mRNA гена *C14orf182* и в mRNA гена *CYB5RL* соответственно.



«» – водородные связи между нуклеотидами miRNA и mRNA;

«*» – позиция начала сайта связывания miR-619-5p в mRNA гена; «.» – одинаковые нуклеотиды.

Рисунок 1 - miR-5095, miR-5096 и miR-5585 сайты связывания в 5'UTR (А), CDS (В) и 3'UTR (С) генов человека.

В CDS и 3'UTR гена *ISY1* найдены сайты связывания для miR-5095 и miR-619-5p. В CDS и 3'UTR гена *ZNF714* найдены сайты связывания для miR-5096 и miR-619-5p, а в mRNA гена *C8orf44* только для miR-619-5p. Нуклеотидные последовательности участков CDS mRNA генов *C8orf44*, *ISY1* и *ZNF714*, содержащих сайты связывания с miR-619-5p, которые кодируют следующие олигопептиды: ENHWKGRARWLM**PVI PALWEAK**AGRS (*C8orf44*)
LFEKERQVRWLM**PVI PALWEAE**AGGS (*ISY1*)
KHKRIQQGMV**ANACNPNT**LRGLGEQI (*ZNF714*)

Первые два олигопептида кодируются в одной рамке считывания и кодируемые аминокислоты, начиная с сайта связывания miR-619-5p, являются высоко консервативными (они выделены жирным шрифтом). Гомологичный олигонуклеотид сайта связывания miR-619-5p в mRNA гена *ZNF714* кодирует олигопептид в другой рамке считывания. Возникновение в белок-кодирующей области сайта связывания miR-619-5p в трех различных по функции генах и сохранение сайтов в процессе эволюции свидетельствует о более важной роли miRNA в регуляции экспрессии этих генов по сравнению с функцией аминокислот в составе доменов этих белков.

Нуклеотидные последовательности участков mRNA генов *C8orf44*, *ISY1* и *ZNF714*, содержащие сайты связывания miR-619-5p в CDS гомологичны между собой и гомологичны таковым в сайтах связывания расположенным в 5'UTR и 3'UTR.

В mRNA олигонуклеотиды сайтов связывания miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585, а также прилегающие нуклеотидные последовательности после сайта связывания высоко гомологичны. По-видимому, они являются сайтами связывания для других miRNA. Участки перед сайтами связывания miR-5096 и miR-5585-3p в 5'UTR, CDS и 3'UTR по этой же причине являются

гомологичными. Нуклеотидная последовательность, расположенная до сайтов связывания с miR-5095 в mRNA, изученных генов, не имеет гомологии и в них нами не выявлены сайты связывания с другими miRNA. Участок из 10 нуклеотидов перед сайтами связывания miR-619-5p содержит гомологичные нуклеотидные последовательности, вероятно, потому что там расположены сайты связывания с miR-5095.

Сайты связывания с miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 miR-5585-3p, в основном, расположены в 3'UTR mRNA генов-мишеней. По-видимому, это связано с тем, что в CDS трудно сохранять нуклеотидные последовательности сайтов связывания с одной miRNA в таком количестве генов. mRNA многих генов-мишеней содержат около 400 нуклеотидов и размещение в их кодирующей нуклеотидной последовательности двух и более консервативных сайтов связывания miRNA маловероятно. В некоторых генах сайты связывания miRNA находятся в 5'UTR, однако в изученных mRNA доля таких генов мала.

Множественные сайты связывания в mRNA генов мишеней miRNA. mRNA некоторых генов имеют по несколько сайтов связывания miRNA. Нами были выявлены нуклеотидные последовательности участков длиной 95 н., содержащие множественные сайты связывания с miR-619-5p, miR-5096, miR-5095 и miR-5585-3p. Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени гомологии сайтов связывания с miRNA в mRNA не только каждого гена, но и в mRNA разных генов. Кроме сайтов связывания, многие нуклеотидные последовательности участков тоже гомологичны. Вероятно, что нуклеотидные последовательности, прилежащие к сайтам связывания, являются сайтами связывания других miRNA. Установлены гены, которые являются мишенями для miR-619-5p, miR-5096, miR-5095 и miR-5585-3p. Три гена-мишени для этих miRNA содержали сайты связывания в 5'UTR. Степень гомологии нуклеотидных последовательностей высокая не только в сайтах связывания изученных miRNA, но и по всему участку длиной 150 н. Расстояние между сайтами связывания miR-5095 и miR-5096 было равно 57 - 59 н. и между сайтами связывания miR-5096 и miR-5585-3p было равно 46 - 47 н. Сайты связывания miR-5095 и miR-619-5p частично совмещены. Большая часть сайтов связывания miR-619-5p, miR-5096, miR-5095 и miR-5585-3p располагалась в 3'UTR и поэтому было много генов-мишеней, которые имеют одновременно сайты связывания miRNA.

Степень гомологии нуклеотидных последовательностей в участках, содержащих сайты связывания miR-619-5p, miR-5096, miR-5095 и miR-5585-3p, является высокой. Кроме изученных miRNA, в этих участках имеются сайты для других miRNA, которые найдены не во всех генах и с меньшим сродством связываются с ними (данные не приведены). Возможно, поэтому в участках есть консервативные домены нуклеотидных последовательностей.

Обнаруженное нами большое число сайтов связывания некоторых miRNA в mRNA множества генов позволяет предположить их новые функциональные возможности. Эти miRNA, вероятно, являются координаторами экспрессии генов, участвующих во многих важнейших биологических процессах. Во многих работах показано влияние miRNA на экспрессию генов, кодирующих транскрипционных факторы [12, 13] и белки, участвующие в клеточном цикле [3, 14-16], апоптозе [4, 17-19], ответе на стресс и т.д. Если эти белки определяют лимитирующую стадию многостадийного процесса, то контроля над такими белками достаточно для управления многостадийным процессом. В частности, значительную часть генов мишеней для miR-5095 и miR-5096 составляют гены транскрипционных факторов. В итоге, одна или несколько miRNA, регулируя экспрессию нескольких сот генов, будут создавать систему взаимосвязанных процессов в клетках и в организме. Такая роль этих miRNA вполне возможна, поскольку они циркулируют в крови и для них доступны практически все клетки организма [20, 21]. В норме, функционирование системы взаимосвязанных процессов с участием miRNA является устойчивым, поскольку незначительные отклонения в экспрессии белок-кодирующих генов или обычных miRNA не могут сильно повлиять на работу системы. С другой стороны, система уязвима в отдельной клетке, поскольку, может нарушаться при изменении экспрессии miRNA. Например, установлено, что в нормальных клетках уровень экспрессии miR-5096 низкий, а в опухолевых клетках многократно повышен. В этом случае будет подавлена экспрессия многих ее генов-мишеней и функционирование клетки становится несбалансированным, либо неконтролируемым. Для уменьшения последствий такого развития событий в клетке и организме должны функционировать несколько взаимосвязанных miRNA. Эта взаимосвязь осуществляется посредством наличия общих генов-мишеней для таких miRNA. В этом

случае, потеря или увеличение влияния одного компонента (miRNA) регуляторной системы будет в меньшей степени отражаться на функционировании всей системы.

Полученные, в настоящей работе, данные дают возможность на основе новых представлений о свойствах miRNA провести системное исследование роли уникальных и обычных miRNA в регуляции экспрессии генов в клетках человека.

Литература

- 1 Doxakis E., Principles of miRNA-Target Regulation in Metazoan Models // *Ин. J Mol Sci.* - 2013. - Vol. 14. - No. 8, P. 16280–16302.
- 2 Tang G., siRNA and miRNA: an insight into RISCs // *Trends Biochem Sci.* - 2005. - Vol. 30. - No. 2, P. 106–114.
- 3 Luo Q., Li X., Li J., Kong X., Zhang J., Chen L., et al., miR-15a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer // *Ин. J Oncol.* - 2013. - Vol. 43. - No. 4, P. 1212–1218.
- 4 Li X., Chen Y.T., Jossou S., Mukhopadhyay N.K., Kim J., Freeman M.R., et al. MicroRNA-185 and 342 inhibit tumorigenicity and induce apoptosis through blockade of the SREBP metabolic pathway in prostate cancer cells // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - No. 8, P. e70987.
- 5 Qian N.S., Liu W.H., Lv W.P., Xiang X., Su M., Raut V., et al., Upregulated MicroRNA-92b regulates the differentiation and proliferation of EpCAM-positive fetal liver cells by targeting C/EBP β // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - No. 8, P. e68004.
- 6 Rogers K., and Chen X., Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs // *Plant Cell.* - 2013. - Vol. 25. - No. 7, P. 2383–2399.
- 7 Ling Y.H., Ding J.P., Zhang X.D., Wang L.J., Zhang Y.H., Li Y.S., et al., Characterization of microRNAs from goat, *Capra hircus* by Solexa deep-sequencing technology // *Genet Mol Res.* - 2013. - Vol. 12. - No. 2, P. 1951–1961.
- 8 Guo Q.J., Mills J.N., Bandurraga S.G., Nogueira L.M., Mason N.J., Camp E.R., et al., MicroRNA-510 promotes cell and tumor growth by targeting peroxiredoxin1 in breast cancer // *Breast Cancer Res.* - 2013. - Vol. 15. - No. 4, P. R70.
- 9 Magena A., Greco S., Gaetano C., and Martelli F., Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases // *Ин. J Mol Sci.* - 2013. - Vol. 14. - No. 9, P. 17319–17346.
- 10 Swaminathan S., Suzuki K., Seddiki N., Kaplan W., Cowley M.J., Hood C.L., et al., Differential regulation of the Let-7 family of microRNAs in CD4+ T cells alters IL-10 expression // *J Immunol.* - 2012. - Vol. 188. - No. 12, P. 6238–6246.
- 11 Glazkova D.V., Vetchinova A.S., Bogoslovskaya E.V., Zhogina I.A., Markelov M.L., and Shipulin G.A. // Downregulation of human CCR5 receptor gene expression using artificial microRNAs, *Mol Biol.* - 2013. - Vol. 47. - No. 3, P. 475–485.
- 12 Cui Q., Yu Z., Pan Y., Purisima E.O., and Wang E. // MicroRNAs preferentially target the genes with high transcriptional regulation complexity, *Biochem Biophys Res Commun.* - 2007. - Vol. 352. - No. 3, P. 733–738.
- 13 Yan L., Kang M., Qin Z., Zhang W., Li Y., and Ou H., An ironomic miRNA regulates expression of the human endothelial nitric oxide synthase gene and proliferation of endothelial cells by a mechanism related to the transcription factor SP-1 // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - No. 8, P. e70658.
- 14 Wang P., Zou F., Zhang X., Li H., Dulak A., Jr Tomko R.J., et al., microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells // *Cancer Res.* - 2013. - Vol. 69. - No. 20, P. 8157–8165.
- 15 Cui X., Witalison E.E., Chumanovich A.P., Chumanovich A.A., Poudyal D., et al., The induction of microRNA-16 in colon cancer cells by protein arginine deiminase inhibition causes a p53-dependent cell cycle arrest // *PLoS ONE.* - 2013. - Vol. 8. - No. 1, P. e53791.
- 16 Wang Y., Zheng X., Zhang Z., Zhou J., Zhao G., et al., MicroRNA-149 inhibits proliferation and cell cycle progression through the targeting of ZBTB2 in human gastric cancer // *PLoS ONE.* - 2012. - Vol. 7. - No. 10, P. e41693.
- 17 Wang Y., and Lee C.G., MicroRNA and cancer focus on apoptosis // *J Cell Mol Med.* - 2009. - Vol. 13. - No. 1, P. 12–23.
- 18 C. Li, S.M. Hashimi, D.A. Good, S. Cao, W. Duan, P.N. Plummer, Apoptosis and microRNA aberrations in cancer // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* - 2012. - Vol. 39. - No. 8, P. 739–746.
- 19 Lima R.T., Busacca S., Almeida G.M., Gaudino G., Fennell D.A., and Vasconcelos M.H., MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer // *Eur J Cancer.* - 2011. - Vol. 47. - No. 2, P. 163–174.
- 20 Cawley K., Logue S.E., Gorman A.M., Zeng Q., Patterson J., Gupta S. et al., Disruption of microRNA biogenesis confers resistance to ER stress-induced cell death upstream of the mitochondrion // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - No. 8, P. e73870.
- 21 Kumar S., Keerthana R., Pazhanimuthu A., and Perumal P., Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients // *Indian J Biochem Biophys.* - 2013. - Vol. 50. - No. 3, P. 210–214.
- 22 Smith-Vikos T., and Slack F.J., MicroRNAs circulate around Alzheimer's disease // *Genome Biol.* - 2013. - Vol. 14. - No. 7, P. 125.
- 23 Reshmi G., Chandra S.S., Babu V.J., Babu P.S., Sahni W.S., Ramachandran S., et al., Identification and analysis of novel microRNAs from fragile sites of human cervical cancer: computational and experimental approach // *Genomics.* - 2011. - Vol. 97. - No. 6, P. 333–340.